

Signaltransduktion in der Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Piriformospora indica*



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalum (Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl.-Biologin Corinna Drzewiecki
geboren am 13.11.1977 in Gardelegen

Gutachter

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	vi
Zusammenfassung.....	viii
1 Einleitung	1
1.1 Symbiosen	1
1.2 Signaltransduktion in mutualistischen Symbiosen.....	2
1.3 Molekulare Interaktion zwischen <i>Arabidopsis</i> und <i>P. indica</i> – ein Modellsystem.....	4
1.3.1 MATH [meprin and TRAF (tumor necrosis receptor-associated factor) homology]-Proteine	6
1.3.2 Lipide als Signalmoleküle und die Rolle von PDK1 [3-phosphoinositide- dependent kinase 1]	10
1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen [MAPKs]	11
1.4 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2 Enzyme.....	16
2.1.3 Molekulargewichtstandards für Nucleinsäuren und Proteine	16
2.1.4 Kits	17
2.1.5 Oligonucleotide	17
2.1.6 Antikörper	18
2.1.7 Pflanzenmaterial.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Behandlung der Pflanzen	19
2.2.1.1 Wachstumsbedingungen von Pflanze und Pilz	19
2.2.1.2 Isolation homozygoter <i>k.o.</i> Linien.....	19
2.2.1.3 Kreuzung	20
2.2.1.4 Embryoletalitätsnachweis.....	20
2.2.1.5 Ko-Kultivierungsversuche und Bestimmung des Pflanzenwachstums.....	20
2.2.1.6 Analyse der Kolonisierung.....	21
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.2.2.1 DNA-Isolation	21
2.2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	21

2.2.2.3	PCR-Protokol	22
2.2.2.4	<i>Real time</i> PCR	22
2.2.3	Ca ²⁺ -Messungen	22
2.2.4	Herstellung eines Zellwandextrakts (ZWE) von <i>P. indica</i>	22
2.2.5	Protoplastenisolation	23
2.2.5.1	Protoplastenisolation aus <i>Arabidopsis</i> -Blättern	23
2.2.5.2	Protoplastenisolation aus <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln	23
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden	24
2.2.6.1	Gesamtproteinisolation.....	24
2.2.6.2	Zellfraktionierung.....	24
2.2.6.3	Isolation von Plasmamembranen	24
2.2.6.4	Herstellung von Antikörpern gegen MATH1 und MATH2.....	25
2.2.6.5	<i>Peptide Competition Assay</i>	25
2.2.6.6	Western blot	26
2.2.6.7	Endoglykosidaseverdau.....	26
2.2.6.8	Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie	27
2.2.6.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Isolation homozygoter <i>k.o.</i> -Linien und Mutantencharakterisierung	29
3.2	Ko-Kultivierungsversuche	33
3.2.1	Wachstumsantworten des WT bei Ko-Kultivierung mit <i>P. indica</i>	33
3.2.2	Wachstumsantworten der Mutanten während der Ko-Kultivierung mit <i>P. indica</i>	36
3.2.3	Kolonisierungsversuche beim WT und den Mutanten	40
3.2.4	Expressionsanalyse.....	41
3.3	Rolle von MATH2 und MATH3 bei der <i>P. indica</i> -induzierten cytosolischen Ca ²⁺ -Erhöhung	44
3.4	Subzelluläre Lokalisation von MATH1 und MATH2	45
3.4.1	Herstellung von Antikörpern gegen MATH1 und -2.....	45
3.4.1.1	<i>Peptide Competition Assay</i>	46
3.4.2	Zellfraktionierung.....	47
3.4.3	Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie	50
3.4.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	57
3.5	Endoglykosidaseverdau.....	59

4	Diskussion	60
4.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>k.o.</i> -Mutanten	60
4.1.1	Embryoletalität der <i>MATH1 k.o.</i> und der <i>MATH2 x MATH3 k.o.</i> -Mutante	60
4.1.2	Verändertes Spross:Wurzel-Biomasserverhältnis bei <i>MATH2</i> und <i>MAPK6 k.o.</i> -Mutanten	62
4.1.3	<i>PDK1 d.k.o.</i> -Phänotyp.....	63
4.2	Ko-Kultivierungsversuche	63
4.2.1	Ko-Kultivierung des WT mit <i>P. indica</i>	63
4.2.2	Ko-Kultivierung der <i>MATH2</i> und <i>MATH3 k.o.</i> -Linie mit <i>P. indica</i>	67
4.2.3	Ko-Kultivierung der <i>PDK1 k.o.</i> -Linien mit <i>P. indica</i>	70
4.2.4	Ko-Kultivierung der <i>MAPK6 k.o.</i> -Linie mit <i>P. indica</i>	72
4.3	Kolonisierung	72
4.4	Expressionsanalyse.....	73
4.4.1	Regulation der Genexpression von <i>MATH1</i>	73
4.4.2	Regulation der Genexpression von <i>MATH2</i> , <i>MATH3</i> , <i>PDK1.1</i> , <i>PDK1.2</i> , <i>MAPK3</i> und <i>MAPK6</i>	74
4.4.3	Regulation der Genexpression von <i>OXII</i>	75
4.4.4	Regulation der Genexpression von <i>LOX1</i>	76
4.5	Kalzium-Abhängigkeit der untersuchten MATH-Proteine	77
4.6	Lokalisierung und biochemische Charakterisierung von <i>MATH1</i> und <i>MATH2</i>	78
4.7	Putative Rollen von <i>MATH1</i> , -2 und -3 in <i>Arabidopsis</i>	79
	Referenzen.....	83
	Anhang	94
	Publikationen	96
	Selbständigkeitserklärung	97
	Danksagung.....	98

Abkürzungen

aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
AK	Antikörper
AM	Arbuskuläre Mycorrhiza
APS	Ammoniumpersulfat
A.t.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	bric-a-brac/tramtrack/broad complex
d.k.o.	<i>double knock-out</i>
CTR1	constitutive triple response
CUL	Culin
DMP	Dimethyl pimelinediimidate dihydrochloride
DTT	Dithiothreitol
Dx	Dextran
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EIL	<i>ethylene insensitive3/EIN3-like</i>
Endo H _f	Endoglykosidase H _f
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ET	Ethylen
et al.	<i>et alii</i> (latein, und Weitere; hier : Mitarbeiter)
ETR	Ethylenrezeptor
GAPC	Glyceraldehyde-3-phosphatdehydrogenase Untereinheit C
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
kDa	kilo Dalton
k.o.	<i>knock-out</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i> (Kulturmedium für Bakterien)
LOX1	Lipoxygenase1
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
MAM	<i>meprin, A-5 protein, receptor protein tyrosine phosphatase μ</i>
MATH	<i>meprin and TRAF homology</i>
MAPK(KK)	<i>mitogen activated protein kinase (kinase kinase)</i>
MEK(K)	<i>MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (kinase),</i>

	<i>MAPK/ERK kinase (kinase)</i>
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonsäure
MKP	MAPK-Phosphatase
MS	Massenspektrometrie
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NO	Stickstoffoxid
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>pontus hydrogenii</i> (latein, negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration)
<i>P.i.</i>	<i>Piriformospora indica</i>
<i>Pitef1</i>	<i>P. indica elongation factor 1</i>
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POZ	Pox-Virus und Zinkfinger
PR	<i>Pathogenesis-related (gene)</i>
Pt/C	Platin/Kohlenstoff
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBX1	Ring-box 1
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp
ZWE	Zellwandextrakt

Zusammenfassung

Der endophytische Pilz *Piriformospora indica* interagiert mit *Arabidopsis thaliana*, fördert meist Wachstum und Samenproduktion der Pflanze und erhöht die Toleranz gegenüber biotischem und abiotischem Stress. In dieser Arbeit wurde die Rolle der *Arabidopsis*-Proteine MATH1, MATH2, MATH3, PDK1.1, PDK1.2, MAPK3 und MAPK6 in Bezug auf die Interaktion mit *P. indica* untersucht. Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Interaktion in den Pflanzen charakterisiert.

Die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* vollzieht sich in drei Phasen. Die erste Phase ist die Erkennungsphase. Sie findet im verwendeten Versuchssystem in den ersten 4 Tagen nach Inokulation statt. In dieser Phase findet noch keine Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Pilz statt. In ihr laufen die Früherkennung und daraus resultierenden frühen Signalprozesse ab. Die zweite Phase ist die Etablierungsphase. Sie findet im verwendeten Versuchssystem zwischen 4 und 8 Tagen nach Inokulation statt. In dieser Phase findet die Wachstumsförderung der Pflanze durch den Pilz statt. Die Symbiose zu *P. indica* wird aufgebaut. Die dritte Phase ist die eigentliche Symbiosephase dieser Interaktion. Sie findet ab 8 Tagen nach Inokulation statt. Sowohl das Wachstum der Pflanzen als auch die Wachstumsveränderung durch den Pilz haben in dieser Phase ein Plateau erreicht.

Die Rolle der Proteine MATH1, MATH2, MATH3, PDK1.1, PDK1.2, MAPK3 und MAPK6 in Bezug auf die Wachstumsantwort auf *P. indica* wurde mit entsprechenden *k.o.*-Linien untersucht. Die *MATH1 k.o.*-Linie konnte aufgrund der Embryoletalität dieser Linie nicht getestet werden. Ko-Kultivierungsversuche mit den anderen *k.o.*-Linien ergaben, dass die Proteine MATH2, MATH3 und MAPK6 verantwortlich für die Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Pilz sind. Dagegen haben PDK1 und MAPK3 keinen Einfluss auf die Wachstumsreaktion. Eine vollständige Inaktivierung von PDK1 führt unter Standardwachstumsbedingungen dazu, dass die Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien ein verringertes Wachstum zeigen. PDK1 könnte damit das Wachstum regulieren, ohne dabei für den Interaktionsprozess mit *P. indica* direkt entscheidend zu sein.

Mit Ausnahme der *MAPK6 k.o.*-Mutante werden die Wurzeln aller getesteten *k.o.*-Linien weniger durch *P. indica* kolonisiert als der WT. Die stärkste Reduktion der Kolonisierungsrate zeigten die *MATH2 k.o.* und die *MAPK3 k.o.*-Linie. Die Rolle eines Proteins für die Wachstumsreaktion muss damit nicht in direktem Zusammenhang mit einer Rolle bei der Kolonisierung stehen.

Die Expression der Gene *MATH2*, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3* und *MAPK6* wird in der zweiten Phase der Interaktion, der Etablierungsphase, in den WT-Wurzeln transient

hochreguliert. Der Verlauf der Regulation der Genexpression folgt dabei genau dem Verlauf der Wachstumsförderung in den Pflanzen durch den Pilz. Die Gene werden wieder herunterreguliert, sobald die dritte Phase der Interaktion eintritt. Dabei werden *MATH2* und *MAPK3* besonders deutlich reguliert. *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2* und *MAPK6* weisen dagegen nur eine schwache Regulation auf. Alle diese Gene sind damit wichtig für den Aufbau der Symbiose. Für *MATH2* und *MATH3* konnte zudem gezeigt werden, dass sie nicht Kalzium-abhängig reguliert werden, was bestätigt, dass sie nicht in frühe Signalprozesse während der ersten Phase der Interaktion involviert sind. *MATH1*, das ein sehr hohes Expressionsniveau besitzt, ist während der Interaktion nicht reguliert.

MATH1 ist ein hoch abundantes Protein in den Wurzeln. Es ist weniger abundant im Sprossgewebe. Mit fortschreitender Entwicklung der Pflanze ist *MATH1* im Sprossgewebe nicht mehr nachweisbar. Darüberhinaus waren homozygote *MATH1* *k.o.*-Samen nicht mehr in der Lage zu keimen, obwohl sie einen reifen Embryo angelegt hatten. *MATH1* spielt demnach bei der Keimung eine entscheidende Rolle. *MATH2* ist weniger abundant als *MATH1* und ist in Spross- und Wurzelgewebe gleichermassen verteilt. Eine Doppel-*k.o.*-Mutante aus der *MATH2* und *MATH3* *k.o.*-Linie sowie Mutanten, die homozygot *k.o.* für ein Merkmal und heterozygot *k.o.* für das andere Merkmal waren, waren ebenfalls embryoletal. Der Phänotyp war ähnlich dem der *MATH1* *k.o.*-Mutante.

MATH1 und *MATH2* sind an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert und dabei in etwa 100 nm-großen *Clustern* angeordnet. Beide Proteine sind periphere Membranproteine, die nur schwach mit der Membran verankert sind. Sie sind nicht glykosyliert.

1 Einleitung

1.1 Symbiosen

Die Bildung von Symbiosen ist ein sehr verbreitetes Phänomen in der Natur. 80 – 90 % aller Landpflanzen z.B. gehen eine Symbiose mit verschiedenen Pilzen ein und bilden eine Mykorrhiza aus (Newman und Reddell, 1987; Smith und Read, 1997). Die verbreitetste Form der Mykorrhiza ist die arbuskuläre Mykorrhiza (AM), die vorrangig aus den meisten Blütenpflanzen aber auch Farnen und Moosen und Pilzen der Ordnung Glomales (Abteilung Zygomycota; Schüßler *et al.*, 2001, Hibbett und Schüßler, 2007) gebildet wird. Andere Mykorrhizaformen wie die Ektomykorrhiza oder die Ericoide Mykorrhiza bestehen eher aus Bäumen oder holzigen Sträuchern gemäßigter Zonen und vorwiegend Basidiomyceten (Ektomykorrhiza) bzw. Pflanzen karger Berglandschaften der Ordnung Ericales und Ascomyceten (Ericoide Mykorrhiza). Was alle diese Verbindungen jedoch gemeinsam haben ist eine erhöhte Stresstoleranz der Wirtspflanze und ein Austausch von Nährstoffen in beiden Richtungen. Die Pilzpartner erhalten höher molekulare organische Verbindungen von der Pflanze und die Pflanzen werden zusätzlich mit anorganischen Mineralstoffen aus dem Boden versorgt, vor allem mit Phosphat (Smith und Read, 1997; Harrisson *et al.*, 2002; Rausch und Bucher, 2002; Bucking und Heyer, 2003; Karandashov *et al.*, 2004). Heckman *et al.* (2001) konnten zeigen, dass symbiotische Interaktionen zwischen photosynthetisch aktiven Organismen und Pilzen schon sehr früh in der Evolution stattgefunden haben (vor mehr als 460 Millionen Jahren) und vermutlich die Besiedlung des Festlandes beförderten. Vor 60 – 70 Millionen Jahren entwickelte sich die Symbiose zwischen Rhizobien (Bakterien) und Leguminosen, bei der die Bakterien zusätzlich Luft-Stickstoff fixieren und die Pflanze damit versorgen. Im Gegenzug erhalten die Rhizobien höher molekulare organische Verbindungen von der Pflanze.

Darüberhinaus gibt es zahlreiche Interaktionen zwischen Pflanzen und endophytischen Pilzen, bei denen der Pilz verschiedene Lebensstrategien einnehmen kann, von mutualistisch über asymptomatisch (ohne erkennbare Krankheitssymptome) bis parasitisch. Der Ausgang dieser Interaktion beruht auf balanciertem Antagonismus (Schardl *et al.*, 2004; Schulz and Boyle, 2005; Kogel, 2006).

Eine symbiotische Interaktion muss folglich nicht immer vorteilig für die jeweiligen Partner sein. Der Begriff Symbiose bezieht sich daher hier auf die zuerst von de Bary (1879) formulierte und am weitesten gefasste Definition als das “Zusammenleben zweier (verschiedenartiger) Organismen”, das über einen längeren oder permanenten Zeitraum

stattfindet (Smith und Douglas, 1987) und unabhängig vom Ausgang der Interaktion gemeint ist.

Was ist Ausschlag gebend dafür, ob eine Symbiose nützlich oder nachteilig für die jeweiligen Partner ist und welche Faktoren bestimmen darüber? Um miteinander zu interagieren, müssen die Partner zunächst in Kontakt kommen und Signalkaskaden auf molekularer Ebene in Gang setzen. Um zu verstehen, was eine mutualistische Symbiose von einer antagonistischen unterscheidet, ist es notwendig, die Signalstoffe und die zu Grunde liegenden Mechanismen der Signalübertragung und –weiterleitung zu verstehen. Diese Arbeit untersucht die mutualistische Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und dem endophytischen Pilz *Piriformospora indica* in Bezug auf die Signalwege in der Pflanze.

1.2 Signaltransduktion in mutualistischen Symbiosen

Mutualistische Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen wurden bisher vor allem in Verbindung mit Rhizobien und arbuskulären Mykorrhizapilzen untersucht. In beiden Symbiosen gibt es gemeinsame Signalkomponenten (Marx, 2004). Es wird angenommen, dass die Signalwege zuerst in der AM entstanden sind und später während der Entstehung der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien adaptiert wurden (Parniske, 2000). So wie es in der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen Wirt- und Nichtwirtresistenz gibt, gibt es auch bei der AM Wirt-abhängige und Wirt-unabhängige Interaktionen. Mutualistische Interaktionen sind immer kompatibel (Gadkar *et al.*, 2001). In diesen kommt es auch zu Abwehrreaktionen. Diese sind jedoch nicht so stark, häufig transient und meist lokal (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Salzer und Boller, 2000) oder können unterdrückt werden (David *et al.*, 1998). Die Expression von PR (*pathogenesis-related*)-Genen unterbindet dabei nicht die Kolonisierung durch AM-Pilze (Vierheilig *et al.*, 1995).

Bisher isolierte Komponenten der Signaltransduktion in diesen Interaktionen werden im Folgenden kurz aufgeführt.

Zur Erkennung werden Signalstoffe in die Umgebung abgegeben, die dem Partner das Vorhandensein vermitteln. Das sind bei den Mykorrhizapflanzen Strigolactone (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006), die neben mutualistischen auch pathogene Pilze anlocken. Die Pilzpartner sondern daraufhin bisher noch nicht identifizierte Myc-Faktoren ab. Kosuta *et al.* (2003) entdeckten die Existenz eines von einem AM-Pilz stammenden diffusiblen Signalmoleküls, das die Expression pflanzlicher Symbiosegene induziert. Drissner *et al.* (2007) identifizierten Lysophosphatidylcholin (LPC), ein lipophiles Signal, als ein Signal zur Bildung der AM. Zur Bildung der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien werden

Flavonoide von den Pflanzen und daraufhin Nodulations (Nod)-Faktoren von den Rhizobien abgegeben. Nod-Faktoren bestehen aus Lipochitooligosacchariden und ihre Perzeption entwickelte sich aus der Perzeption von Elicitor-Vorfahren wie Lipopolysacchariden oder Chitinen (Boller, 1995; Cullimore *et al.*, 2001; Montesano *et al.*, 2003).

Zur Perzeption binden die Nod- bzw. Myc-Faktoren an pflanzliche Rezeptorkinasen, NORK (*nodulation receptor kinase*; Endré *et al.*, 2002) bzw. SYMRK (*symbiosis-like receptor kinase*; Kistner und Parniske, 2002; Stracke *et al.*, 2002). Zwei NORKs konnten bisher identifiziert werden, NFR1 und NFR5 mit zwei bzw. drei LysM-Domänen, an welche die Lipochitooligosaccharid-Nod-Faktoren vermutlich binden (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2007; Smit *et al.*, 2007). Eine identifizierte SYMRK ist DMI2 (*“does not make infection”*²) aus *Medicago* (Endré *et al.*, 2002) mit einer extrazellulären LRR (*leucin-rich repeat*)-Domäne (Yoshida und Parniske, 2005). Für DMI2 gibt es orthologe Gene in *Lotus japonicus* (Stracke, 2002) und *Pisum sativum* (Schneider, 1999).

Eine Komponente in der darauffolgenden Signaltransduktion ist ein Plastiden-lokalisierter Liganden-vermittelter Kaliumkanal, DMI1, aus *Medicago* (Ané *et al.*, 2004). Zwei Orthologe, CASTOR und POLLUX, wurden aus *Lotus japonicus* isoliert (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005; Peiter *et al.*, 2007).

Zwei Nucleoporine (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007) sind essentiell für Kern-spezifische Kalziumsignaturen in der Symbiose mit Rhizobien und AM-Pilzen (Kosuta *et al.*, 2008). Als Kalziumsensor fungiert DMI3, eine Kern-lokalisierte Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CCaMK) (Levy *et al.*, 2004; Kalo *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2005). CYCLOPS spielt eine Rolle in einem Infektions-spezifischen Zweig in der Etablierung der mutualistischen Symbiose (Kistner *et al.*, 2005). Es enthält ein Kernlokalisationssignal und wird durch CCaMK phosphoryliert.

Weiterhin konnte die Beteiligung von Pflanzenhormonen an der Kommunikation von Leguminosen mit Rhizobien gezeigt werden. Jasmonsäure (JA) inhibiert die Antwort der Pflanze auf Rhizobien. Ethylen (ET) agiert stromabwärts von JA, um den JA-Effekt zu limitieren und interagiert damit antagonistisch zu JA (Zhao und Qi, 2008). Auf der anderen Seite agieren beide synergistisch, um Knöllchenbildung (Nodulation) zu inhibieren (Sun *et al.*, 2006). Zudem ist ET in die Nodulation involviert, in dem es die Bildung infizierter Fasern und die Anordnung von Knöllchenprimordien durch Inhibierung der Zellteilung reguliert. ET könnte somit einige frühe Antworten in den Leguminosen inhibieren (Oldroyd *et al.*, 2001). Zusätzlich wird von Cytokinin angenommen, dass sie zur Nodulation beitragen (Murray *et al.*, 2007; Oldroyd, 2007; Tirichine *et al.*, 2007).

1.3 Molekulare Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* – ein Modellsystem

Die AM lässt sich jedoch nicht mit *Arabidopsis* untersuchen, da *Arabidopsis* kein Wirt für Mykorrhiza-Pilze ist. Mykorrhiza-Pilze sind in der Regel obligat biotroph und können ohne Wirt nicht kultiviert werden (Newman und Reddel, 1987). *Arabidopsis* ist stattdessen in der Lage, mit dem endophytischen Pilz *Piriformospora indica* zu interagieren (Verma *et al.*, 1998). Dieser Pilz wurde in der indischen Thar-Wüste entdeckt und der Familie der Sebacinaceae (Gruppe Hymenomyceten, Basidiomycota) zugeordnet. *P. indica* imitiert eine primitive arbuskuläre Mykorrhiza, fördert das Pflanzenwachstum und die Produktion von Samen und erhöht die Toleranz gegenüber abiotischem und biotischem Stress (Varma *et al.*, 1999; Varma *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2003; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005). Der Pilz lässt sich in axenischer Kultur und ohne Wirt kultivieren und wächst sowohl auf synthetischem Voll- als auch Mangelmedium (Abb. 1.1) (Peskan-Berghöfer *et al.*, 2004, Varma *et al.*, 2001), wo er Sporen bildet (Pham *et al.*, 2004; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Die Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* liefert damit ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung einer mutualistischen Symbiose auf molekularer Ebene.



Abb. 1.1: *Piriformospora indica* auf Käfers Medium (KM)

Da *Arabidopsis* kein natürlicher Wirt für *P. indica* ist, ist auch die Interaktion Wirt-unabhängig und basiert daher eher auf allgemeinen Mechanismen der Erkennung und Signalweiterleitung.

Im Folgenden werden die bis jetzt bekannten Komponenten in *Arabidopsis*, die an der Kommunikation mit *P. indica* beteiligt sind (Abb. 1.3), beschrieben.

Ein *Elicitor* von *P. indica* konnte noch nicht gefunden werden. Das Signal, das vom Pilz ausgeht, besteht möglicherweise aus mehreren Komponenten. Ein Zellwandextrakt aus *P. indica* fördert das Wachstum der Pflanzen (Vadassery *et al.*, 2009).

Weiterhin wurde eine Rezeptorkinase in der Plasmamembran gefunden, die entscheidend für die Interaktion ist und den *Elicitor* von *P. indica* erkennen könnte. Die Rezeptorkinase besitzt eine extrazelluläre LRR-Domäne, die vermutlich für die Bindung des *Elicitors* verantwortlich ist, und eine intrazelluläre atypische Kinasedomäne. In dieser atypischen Domäne sind bestimmte Aminosäuren, die entscheidend für die Kinaseaktivität sind, substituiert. Dadurch

kann diese Kinase ihre Zielproteine nicht mehr direkt phosphorylieren, sondern benötigt dazu Adapterproteine. Diese Rezeptorkinase ist eine putative Komponente in der frühen Erkennungsphase; ihre mRNA ist während dieser Zeit der Interaktion transient hochreguliert (Shahollari *et al.*, 2004 a, b).

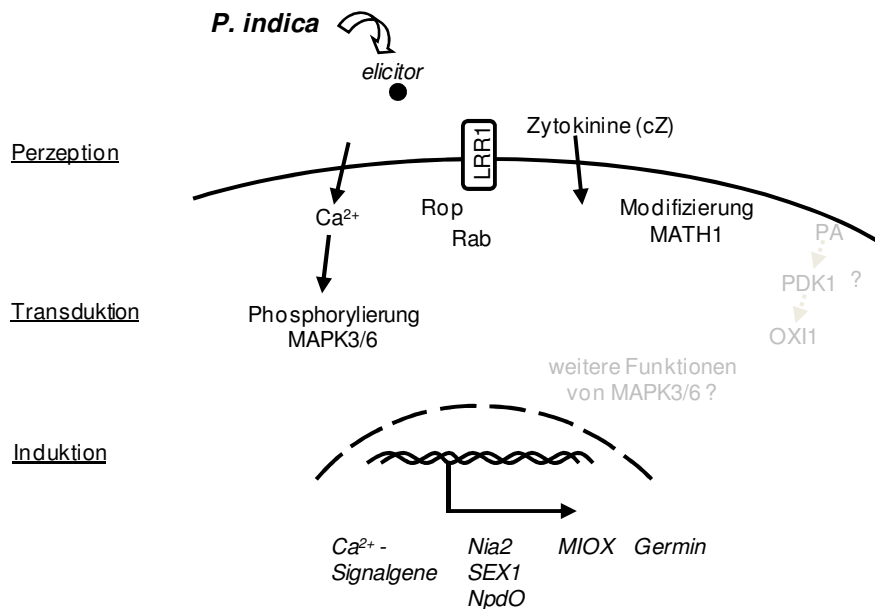


Abb. 1.3: Modellsystem der molekularen Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica*, eigene Graphik. LRR1 – *leucin-rich repeat 1* (Rezeptorkinase), Rab, Rop – Familien von kleinen G-Proteinen, MAPK – Mitogen-aktivierte Proteinkinase, cZ – Zytokinin-Isoform, MATH – *meprin and TRAF* [*tumor necrosis receptor associated factor*] *homology*, PA – Phosphatidsäure, PDK1 – 3-*Phosphoinositide dependent kinase 1*, OXI1 – *oxidative burst-dependent Kinase 1*, Nia2 – *Nitratreduktase2*, SEX1 – *starch excess protein 1*, NpdO – 2-*Nitropropandioxygenase*, MIOX – *myo-inositol oxygenase*. Grau markiert sind vermutete Komponenten (s. Kapitel 1.3.2 und 1.3.3).

Kleine G-Proteine aus der Rop-Familie und ein kleines G-Protein aus der Rab-Familie scheinen ebenfalls eine Rolle in der Interaktion zu spielen.

Die Perzeption von *P. indica* verursacht einen charakteristischen Kalziumeinstrom aus dem Apoplasten in das Cytosol der Wurzelzellen (Vadassery *et al.*, 2009). Dieser Kalziumeinstrom ist begleitet von der Hochregulation von Genen, deren Genprodukte an der Wahrnehmung und Weiterleitung von Kalziumsignalen beteiligt sind, wie z.B. *CIPK13* (*CBL* (*Calcineurin B-like*)-*interacting protein kinase 13*) (Vadassery *et al.*, 2009). Stromabwärts von dieser Kalziumantwort werden die beiden MAP Kinasen MAPK3 und -6 transient phosphoryliert.

Eine Akkumulation von H_2O_2 konnte nicht nachgewiesen werden. Demnach scheint hier, anders als bei pathogenen Interaktionen, kein *oxidative burst* stattzufinden.

Ein Transkriptionsfaktor mit einer Homöobox-Domäne bindet an Promotorelemente von mindestens drei *P. indica*-regulierten Genen, die Schlüsselfunktionen in metabolischen

Prozessen haben. Sie kodieren für die Nitratreduktase (Nia2), das Stärke-abbauende Enzym Glucan-Wasser-Dikinase (SEX1) und die 2-Nitropropandioxygenase (NpdO) (Sherameti *et al.*, 2005). Es konnten noch weitere Gene gefunden werden, die ebenfalls durch den Pilz hochreguliert werden, wie z.B. *MIOX* (*myo-inositol oxygenase*), das in die Ascorbatsynthese involviert ist, und *Germin*, ein Abwehrgen.

Auxin scheint in die Interaktion nicht involviert zu sein, da in kolonisierten Wurzeln keine Unterschiede in freien oder konjugierten Auxingehalten nachzuweisen waren. Im Gegensatz dazu konnten erhöhte Zytokiningehalte in den Wurzeln in Gegenwart des Pilzes festgestellt werden. Zytokinin scheint jedoch nicht direkt für die Wachstumsantwort der Pflanze verantwortlich zu sein. Allerdings kann die Pflanze nicht mehr auf den Pilz reagieren, wenn alle drei Zytokininrezeptoren, CRE, AHK2, und AHK3, inaktiviert sind (Vadassery *et al.*, 2008).

Die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* führt zu einer transienten Modifizierung eines bisher nicht untersuchten MATH [*meprin and TRAF (tumor necrosis receptor-associated factor) homology*]-Proteins, das ein N-terminales Signalpeptid und zwei MATH-Domänen besitzt (Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Die Modifizierung dieses Proteins erreicht ihr Maximum nach fünf Tagen und verschwindet, sobald die Interaktion etabliert ist (nach neun Tagen) (Oelmüller *et al.*, 2005). Die Untersuchungen zu diesem MATH-Protein ist eins der Hauptthemen in dieser Arbeit (Kapitel 1.4.1).

Weiterhin zentral in dieser Arbeit ist die Analyse von Kinasen aus zwei Proteinfamilien, die Lipid-bindende 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1; Kapitel 1.4.2) und die MAP Kinasen MAPK3 und -6 (Kapitel 1.4.3). Diese Kinasen spielen eine Rolle in der Interaktion mit Pathogenen und wurden in mutualistischen Interaktionen bisher noch nicht untersucht.

1.3.1 MATH [*meprin and TRAF (tumor necrosis receptor-associated factor) homology*]-Proteine

Es gibt 59 *MATH*-Gene im *Arabidopsis*-Genom, deren Genprodukte eine bis vier MATH-Domänen enthalten.

Das MATH-Motiv ist definiert durch die Homologie zwischen der TRAF-C-Domäne von tierischen TRAF-Proteinen und einer C-terminalen Region in Meprinen von Säugern (Uren und Vaux, 1996).

Meprine sind Gewebe-spezifische Zinkendopeptidasen der Astacin-Familie bei Säugern (Bond und Beynon, 1995; Stöcker *et al.*, 1995). Sie bestehen aus mehreren Domänen, sind hoch glykosyliert und extrazellulär. Sie sind in Entwicklungs- und Krankheitsprozessen

beteiligt und hydrolysieren eine Reihe von Peptiden und Proteinen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine und extrazelluläre Matrixproteine (Yamaguchi *et al.*, 1992; Bond und Beynon, 1995; Villa *et al.*, 2003). Meprine können aus α - und β -Untereinheiten (Heterodimere) oder nur α -Untereinheiten (Homodimere) bestehen (Gorbea *et al.*, 1991) (Abb. 1.4 a). Die MATH-Domäne in Meprinen ist notwendig für die Faltung eines aktivierbaren Zymogens (Tsukuba und Bond, 1998). Heterodimere Meprine bilden Plasmamembran-gebundene heterodimere Tetramere durch Interaktionen zwischen der MAM-Domäne N-terminal zur MATH-Domäne (Marchand *et al.*, 1994; Marchand *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu verlieren Meprine, die nur aus Unterheit α bestehen, während ihrer Biosynthese ihre Transmembrandomäne (Marchand *et al.*, 1995). Sie werden folglich in den extrazellulären Raum sekretiert, wo sie zu grossen Komplexen oligomerisieren und sich durch den extrazellulären Raum als grosse Metalloproteasen bewegen (Marchand *et al.*, 1994).

TRAF [*tumor necrosis receptor associated factor*]-Proteine gehören zu einer Familie von cytoplasmatischen Adapterproteinen, die die Signaltransduktion von verschiedenen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie und der Interleukin-1-Rezeptoren vermitteln (Boucher *et al.*, 1997; Arch *et al.*, 1998; Rothe *et al.*, 1994). Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellerhaltung und Zelltod und fördern den Zellerhalt durch Aktivierung von Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren der NF- κ B- und AP-1-Familie (Rothe *et al.*, 1995; Arch *et al.*, 1998). TRAFs bestehen aus einer N-terminalen Ringfingerdomäne, ein bis sieben Zinkfingerdomänen (je nach TRAF-Protein), einer *coiled-coiled* Region (TRAF-N) und einer MATH-Domäne (TRAF-C) C-terminal zur *coiled-coiled* Region (Rothe *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2002) (Abb. 1.4 b). Ring- und Zinkfingerdomänen sind verantwortlich für die Signalweiterleitung. Die *coiled-coiled* Region (TRAF-N) ist dagegen verantwortlich für eine trimerische Selbstassoziation (Rothe *et al.*, 1995, Takeuchi *et al.*, 1996; Mc Whirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999). Die MATH-Domäne scheint eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne zu sein und ist vermutlich notwendig für die Bindung an Rezeptoren oder andere Signaltransduktoren für TRAF-TRAF-Interaktionen (Uren und Vaux, 1996).

Warum besitzen Meprine und TRAFs eine gemeinsame konservierte MATH-Domäne, obwohl sie funktionell sowie räumlich nichts miteinander zu tun haben? Eine mögliche Erklärung wurde von Sunnerhagen *et al.* (2002) vorgeschlagen. Beide Proteine besitzen Gemeinsamkeiten in der Interaktion ihrer Untereinheiten durch relative Position der Oligomerisierungsdomäne zur MATH-Domäne (N gegen C) (Abb. 1.4 a und b). Die Untereinheiten beider Proteinklassen müssen assemblieren, um funktionsfähig zu sein.

Trimerisierung der *coiled-coiled* TRAF-N-Region und der MATH-Domäne C-terminal zur TRAF-N-Region von TRAF-Proteinen scheint entscheidend zu sein für die korrekte Bindung an Rezeptoren (Mc Wither *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Heterodimere Meprine bilden Tetramere durch Interaktionen zwischen den MAM-Domänen N-terminal zur MATH-Domäne. Zudem sind bestimmte Sequenzen, die in die Interaktion involviert sind, zwischen Meprinen und TRAF-Proteinen hoch konserviert. Das lässt vermuten, dass die Oligomerisierungsoberflächen zwischen TRAFs und Meprinen strukturell ähnlich sind.

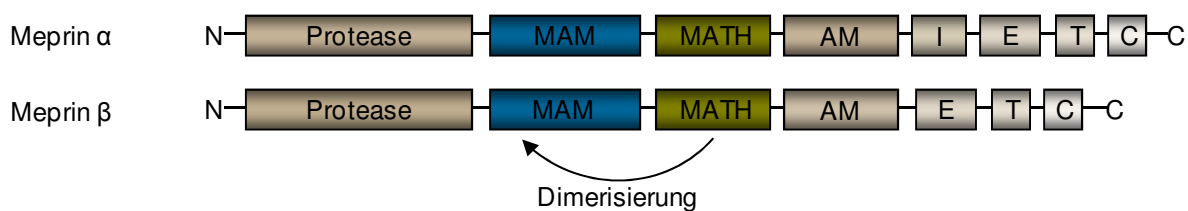


Abb. 1.4 a: Domänentopologie von Meprinen bestehend aus α- und β-Untereinheiten. MAM - Meprin, A-5-Protein, Rezeptorprotein-Tyrosinphosphatase μ, MATH - meprin and TRAF (tumor necrosis recceptor-associated factor) homology, AM - after MATH, I - inserted domain, E - epidermal growth factor, T - Transmembrandomäne (putativ), C - cytosolische Domäne (Marchand *et al.*, 1995).

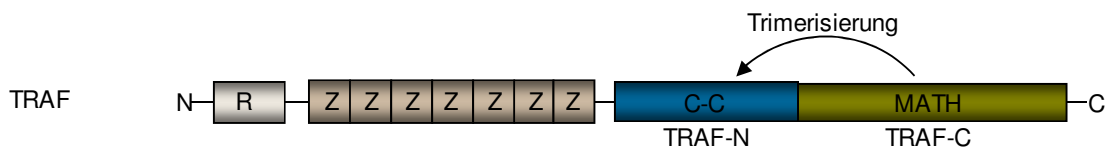


Abb. 1.4 b: Domänentopologie von TRAF-Proteinen. R - Ringfinger, Z - Zinkfinger, C-C - *coiled-coiled* Domäne, MATH - meprin and TRAF (tumor necrosis recceptor-associated factor) homology. Die Anzahl der Zinkfingerdomänen variiert von TRAF-Protein zu TRAF-Protein (verändert nach Chung *et al.*, 2002).

MATH-Domänen konnten auch in anderen Proteinen als Protein-Protein-Bindedomäne gefunden werden, allerdings nicht im Kontext des selben Mechanismus der Untereinheitenassemblierung wie zuvor für TRAFs und Meprine beschrieben. BTB [*bric-a-brac*/*tramtrack*/*broad complex*]-Proteine z.B., die ebenfalls eine MATH-Domäne enthalten, wurden als eine Klasse von Ubiquitinligasen (E3) beschrieben, die mit Culin(CUL)3-RBX1 (*Ring-box1*)-Komplexen in *Caenorhabditis elegans* (Dow und Mains, 1998; Pintard *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003), im Menschen (Kwon *et al.*, 2006), in Reis (Gingerich *et al.*, 2007), und *Arabidopsis* (Weber *et al.*, 2005, Gingerich *et al.*, 2005, Figueroa *et al.*, 2005) interagieren. CUL3 dient dabei als Rückgrat und RBX1 als Mediator für die Bindung Ubiquitin-konjugierender Enzyme (E2). Die BTB-Proteine binden dabei mit ihrer C-terminalen Domäne an den N-Terminus von CUL3 und mit ihrer N-terminalen MATH-

Domäne an Substrate für die Proteolyse. Sie fungieren damit als Substratadapterproteine in Ubiquitinligasekomplexen (Abb. 1.5).

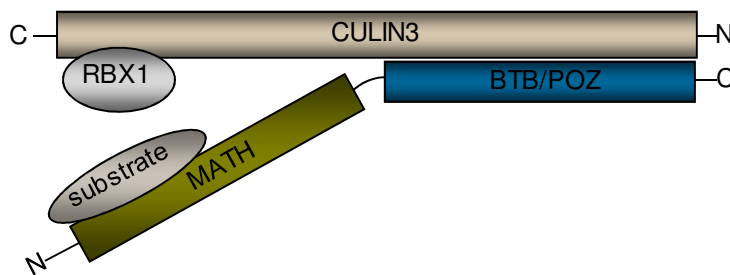


Abb. 1.5: Ubiquitinligase (E3)-Komplex mit Cul3 (CUL3) als Rückgrat, RBX1 (Ring-hox1) als Adapter an Ubiquitin-konjugierende Proteine (E2) und BPM [BTB (bric-a-brac/tramtrack/broad complex)-POZ (Pox virus and Zinc finger)-MATH] als Adapter für Proteine, die proteolysiert werden sollen (Weber *et al.*, 2005).

Von den 59 *MATH*-Genen in *Arabidopsis* gehören sechs zu den BTB-Proteinen und werden in *Arabidopsis* als BMP [BTB-POZ(*P*ox virus and *Z*inc finger)-*M*ATH]-Proteine bezeichnet (Weber *et al.*, 2005). Weitere sechs Gene kodieren für Proteine, die ebenfalls eine andere Domäne benachbart zur MATH-Domäne besitzen. In all diesen Proteinen ist die MATH-Domäne N-terminal zur benachbarten Domäne lokalisiert. Die restlichen 47 MATH-Proteine besitzen jeweils eine bis drei MATH-Domänen. Die meisten dieser MATH-Proteine besitzen allerdings zwei Domänen wie auch das Protein, das durch *P. indica* transient modifiziert wird (Kapitel 1.4; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Oelmüller *et al.*, 2005), welches als MATH1 bezeichnet wurde (Abb. 1.6).

Die Funktion der MATH-Proteine in *Arabidopsis* ist bis auf die BMP-Proteine weitestgehend unbekannt. Sie können entweder in Membransystemen, im Cytosol, im Kern, in Peroxisomen oder Plastiden lokalisiert sein (Oelmüller *et al.*, 2005).

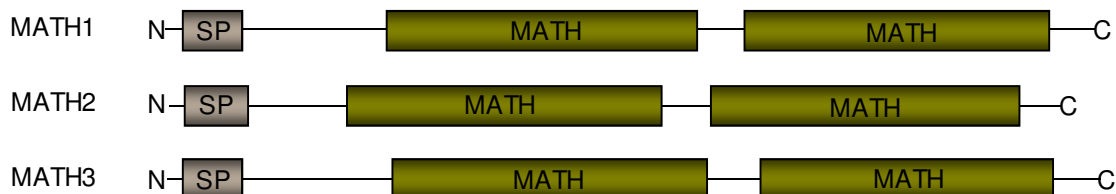


Abb. 1.6: Domänenentopologie von MATH1, -2 und -3, eigene Graphik.

Phylogenetische Analysen ergaben, dass MATH1 (At3g20370) eng verwandt ist mit zwei weiteren MATH-Proteinen (Oelmüller *et al.*, 2005), MATH2 (At3g20360) und MATH3 (At3g20380) (Abb. 1.6). Die Sequenzhomologien zwischen den drei Proteinen betragen jeweils ca. 70 %. Es ist unklar, ob die drei Proteine funktionell redundant sind.

1.3.2 Lipide als Signalmoleküle und die Rolle von PDK1 [*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*]

Lipide sind die Grundbausteine der Zellmembranen und dienen in Pflanzen als Kohlenstoffspeicher. Darüberhinaus sind sie an der Regulation von Zellfunktionen beteiligt, wie der Umordnung des Cytoskellets, dem Membrantransport und der Antwort auf Stresseinwirkungen. Neben der Aufrechterhaltung einer normalen Zellfunktion sind sie somit auch integraler Bestandteil von Signaltransduktionsprozessen. Die meisten Signallipide sind Zwischenprodukte in der Membranlipidbiosynthese oder Bestandteile der Zellmembranen selber wie z.B. Phosphatidsäure (PA) und ihre Derivate Phosphatidylinositole (PtdIns, PIs), verschiedene Inositolphosphate (InsP, IPs), Phosphatidylglycerin, Diacylglycerin (DAG), Diacylglycerinpyrophosphat (DAGPP), Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholinamin oder freie Fettsäuren, die Vorläufer von PA (Meijer und Munnik, 2003; Wang, 2004; van Schooten *et al.*, 2006). Daneben gibt es noch weitere Lipide mit Signalfunktion wie Sphingolipide, Oxylipine und Sterole (Wang, 2004). Im Gegensatz zu Untersuchungen bei Tieren kristallisierte sich PA in Pflanzen als zentrales Lipidsignalmolekül heraus. Es ist involviert in Signalwege bei Verwundung, Abszissinsäure (ABA), ET, Abwehrreaktionen gegen Pathogene (de Jong *et al.*, 2004), oxidativem und osmotischem Stress und der Nod-Faktor-Signalleitung. PA gilt in Pflanzen als sekundärer Botenstoff (Munnik, 2001; Laxalt und Munnik, 2002). Dabei bindet PA vermutlich an ihre Zielproteine, um die Aktivität dieser Proteine zu erhöhen oder zu unterbinden (Testerink und Munnik, 2005). Es ist auch möglich, dass PA als Anker für die Assemblierung von Signalproteinen fungiert (Meijer und Munnik, 2003; van Leuwen *et al.*, 2004). Abgesehen davon wird PA als Substrat betrachtet, das mit der Produktion anderer zuvor erwähnter regulatorischer Lipide verbunden ist.

Signallipide vermitteln Signalkaskaden, indem ihr Gehalt rasant ansteigt und genauso schnell wieder herunterreguliert wird. Als Signallipide haben sie folglich eine sehr viel schnellere Umsatzrate als Strukturlipide. Diese Umsetzung wird durch Lipid-hydrolysierende Enzyme wie Phospholipase A, C und D sowie Lipidkinasen und -phosphatasen wie die Diacylglycerinkinase (DAGK) realisiert (Testerink und Munnik, 2005).

Wie profitiert die Zelle von den Signalinformationen, die an der Membran entstehen? Enzyme mit Lipid-Bindedomänen binden an diese Signallipide und werden daraufhin aktiviert. Sie machen dadurch eine Konformationsänderung durch und leiten die Signale so weiter. Die bisher bekanntesten Lipid-Bindedomänen von *Arabidopsis*-Proteinen sind die *Pleckstrin*-Homologie (PH)-Domäne, eine FYVE-Motiv-Domäne und eine Phox (PX)-Homologie-Domäne. Für die meisten dieser Lipid-Bindedomänen ist noch nicht bekannt, an welches

Lipid sie binden (van Leuwen *et al.*, 2004). Eins der ersten Lipid-bindenden Proteine, das in *Arabidopsis* gefunden wurde, ist die 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1; Deak *et al.*, 1999). Sie enthält eine N-terminale Kinase- und eine C-terminale PH-Domäne. AtPDK1 ist das orthologe Protein zu PDK1 in Tieren, welches die Balance zwischen Wachstum, Zellteilung und Apoptose aufrecht erhält und reguliert (Storz und Toker, 2002; Mora *et al.*, 2004). Bis jetzt ist nicht klar, ob PDK1 in *Arabidopsis* dieselbe Funktion erfüllt. In *Arabidopsis* gibt es zwei homologe Gene für PDK1, *PDK1.1* und *PDK1.2*, mit einer Sequenzhomologie von 92 %. Im Gegensatz zu PDK1 in Tieren ist die PH-Domäne von AtPDK1 weniger konserviert und bindet an verschiedene Lipide (Deak *et al.*, 1999). AtPDK1 wird in allen Geweben exprimiert (Anthony *et al.*, 2004). Sie aktiviert und phosphoryliert Serin/Threonin-Kinasen der AGC (cAMP-abhängige, cGMP-abhängige Proteinkinase C- (PKC))–Familie. Einige Substrate von PDK1 konnten bisher gefunden werden. PDK1.1 aktiviert z.B. AGC2.1/OXI1, nachdem es selber durch PA aktiviert wurde (Anthony *et al.*, 2004). Dieser Signalweg führt zu Abwehrreaktionen bei Pathogenbefall (Anthony *et al.*, 2006). AGC2.1/OXI1 wird neben PDK1 auch durch oxidativen Stress aktiviert und agiert stromaufwärts der MAP Kinasen MAPK3 und -6. AGC2.1/OXI1 kann demnach durch mindestens einen weiteren von PA-PDK1.1-unabhängigen Signalweg aktiviert werden (Anthony *et al.*, 2006). Weitere bereits identifizierte PDK1-Substrate sind PID (PINOID; Zegzouti *et al.*, 2006 a) und die S6-Kinase, ein Analogon zur S6-Kinase in Säugern (Otterhag *et al.*, 2004).

1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen [MAPKs]

Eine zentrale Rolle in der Regulation vieler Zellfunktionen kommt Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) zu. Sie umfassen eine eigene Subfamilie innerhalb der Superfamilie der Proteinkinasen in allen eukaryotischen Zellen (Hamel *et al.*, 2006). Dabei bilden sie ein Kinasemodul, das etliche zelluläre Ereignisse einschliesslich der Antworten auf extrazelluläre Signale sowie Mitogen-induzierte Zellzyklusprogression während der G1-Phase reguliert. MAP Kinasen dienen somit als funktionelle Verbindung zwischen der Adaptation an extrazelluläre Signale und einer veränderten Genexpression (MAPK Group, 2002; Yang *et al.*, 2003). Es handelt sich dabei um einen evolutionär alten Mechanismus, weshalb die Kinasen durch hoch konservierte Gene kodiert werden (Widmann *et al.*, 1999). Weil die transkriptionelle Aktivierung von Genen, die durch MAPK-Kaskaden hervorgerufen werden, innerhalb von Minuten stattfindet, gehört dieser Mechanismus zu “frühen” Antworten in der Signaltransduktion (Asai *et al.*, 2002; Kroj *et al.*, 2003).

Pathogene und von Pathogenen stammende Elicitoren, abiotischer Stress und Hormone sind einige der Stimuli, die MAPK-Kaskaden induzieren (Zwerger und Hirt, 2001). In den meisten Fällen besteht ein MAPK-Modul aus drei Kinasen. Dabei wird zunächst eine MAPKKK nach Signalperzeption durch ein Zielprotein aktiviert. Daraufhin aktiviert diese MAPKKK ihr Substrat, eine MAPKK, durch duale Phosphorylierung. Als Folge dessen aktiviert diese MAPKK eine MAPK, ebenfalls durch duale Phosphorylierung (Zwerger und Hirt, 2001; MAPK Group, 2002). Diese MAPK wird im Cytosol oder in den Kern transloziert, wo sie an Transkriptionsfaktoren bindet und diese aktiviert (Peck, 2003; Lee *et al.*, 2004; Feilner *et al.*, 2005). In Pflanzen handelt es sich dabei meistens um WRKY-Transkriptionsfaktoren, die beispielsweise an W-Boxen von *PR*-Genen binden. Nicht jede MAPK-Kaskade muss aus drei Kinasen bestehen. Zudem kann auch in einigen Fällen eine MAPKKKK (MAP4K) beteiligt sein (Dan *et al.*, 2001; Llompарт *et al.*, 2003). Die Aktivierung einer MAPK-Kaskade ist ein transients und reversibler Prozess, bei dem MAPKs durch MAPK Phosphatasen inaktiviert und dephosphoryliert werden (Farooq *et al.*, 2001; Lee und Ellis, 2007; Schweighofer *et al.*, 2007).

Basierend auf Sequenzhomologien wurden in *Arabidopsis* 60 Gene, die für MAPKKKs kodieren, gefunden (MAPK Group, 2002). Sie sind in drei Untergruppen unterteilt, die *MEKKs* (*MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase kinases*), die *Raf*-Superfamilie und die *MEKK*-verwandten Gene, die jedoch nicht in MAPK-Modulen fungieren. Im Gegensatz dazu gibt es 10 *MAPKKs* im *Arabidopsis*-Genom (MAPK Group, 2002). Die entsprechenden Genprodukte enthalten ein putatives S/TXXXXXS/T-Motiv, an dem sie von MAPKKKs phosphoryliert werden. Es gibt 20 *MAPK*-Gene in *Arabidopsis* (MAPK Group, 2002), die wiederum in vier Untergruppen unterteilt sind. Drei dieser MAPK-Untergruppen enthalten ein TEY-Motiv, an dem sie phosphoryliert werden, eine Untergruppe enthält ein TDY-Motiv zur Phosphorylierung. Einige dieser MAPKs haben redundante Funktionen (Asai *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2006).

Einige MAPK(KK)-abhängige Signalwege konnten in den vergangenen Jahren aufgeklärt werden (Abb. 1.7). Pathogene Interaktion, z.B. nach Perzeption von Flagellin 22, einem 22-Aminosäuren-Peptid aus der Flagella von Gram-negativen Bakterien, führt zur Aktivierung der MAPKKK MEKK1. Daraufhin werden die MAPKKs MEK4 und -5 aktiviert, die wiederum MAPK3 und -6 aktivieren. Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren WRKY22 und -29 und zu Abwehrreaktionen (Asai *et al.*, 2002). Dieser Signalweg ist Kalzium-abhängig, aber unabhängig oder stromaufwärts vom *oxidative burst*. MAPK3 und -6 werden auch bei oxidativem Stress durch MEK4 und diese durch ANP1 aktiviert (Kovtun *et*

al., 2000; Rentel *et al.*, 2004). ANP1 unterdrückt ausserdem die Auxin-Antwort. Bei Verwundung wird MEKK1 aktiviert, die daraufhin die MAPKKs MEK1 und MEK2 aktiviert (Hadiarto *et al.*, 2006). MEK1 bzw. -2 aktivieren danach MAPK4. In diesem Signalweg fungiert MAPK4 als Antagonist in der Regulation der Pathogenabwehr, indem sie SA-abhängige Resistenzmechanismen unterdrückt und JA-abhängige (*PR1*, *PR2* und *ICS1*; Andreasson *et al.*, 2005) induziert (Petersen *et al.*, 2000). Weiterhin sind die Transkriptionsfaktoren WRKY25 und -33 in diesen Signalweg involviert. Neuerdings wurde entdeckt, dass JA-abhängige Signaltransduktion ausserdem von der Aktivierung durch MAPKK3 und MAPK6 begleitet ist (Takahashi *et al.*, 2007). Die ET-Antwort ist negativ reguliert durch CTR1 (*constitutive triple response1*), eine MAPKKK, die anders als MEKK1 und ANP1 zur Raf-Gruppe gehört. Ohne Ethylen (ET) hält der ET-Rezeptor ETR1 CTR1 in einem aktiven Status, der damit die ET-Antwort unterdrückt. Sobald ET an ETR1 bindet, wird der Repressor CTR1 inaktiviert und somit die Aktivierung der MAPK-Kaskade MAPKK7/9 (Yoo *et al.*, 2008) -MAPK6/13 (Ouaked *et al.*, 2003; Liu und Zheng, 2004) ausgelöst. Kälte- und Salzstress führt zur Aktivierung der MAPKKK MEKK1 (Mizoguchi *et al.*, 1996), die daraufhin MEK1/2 aktiviert (Ishimura *et al.*, 1998). Darauf folgt die Aktivierung von MAPK4 und -6 (Teige *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2000).

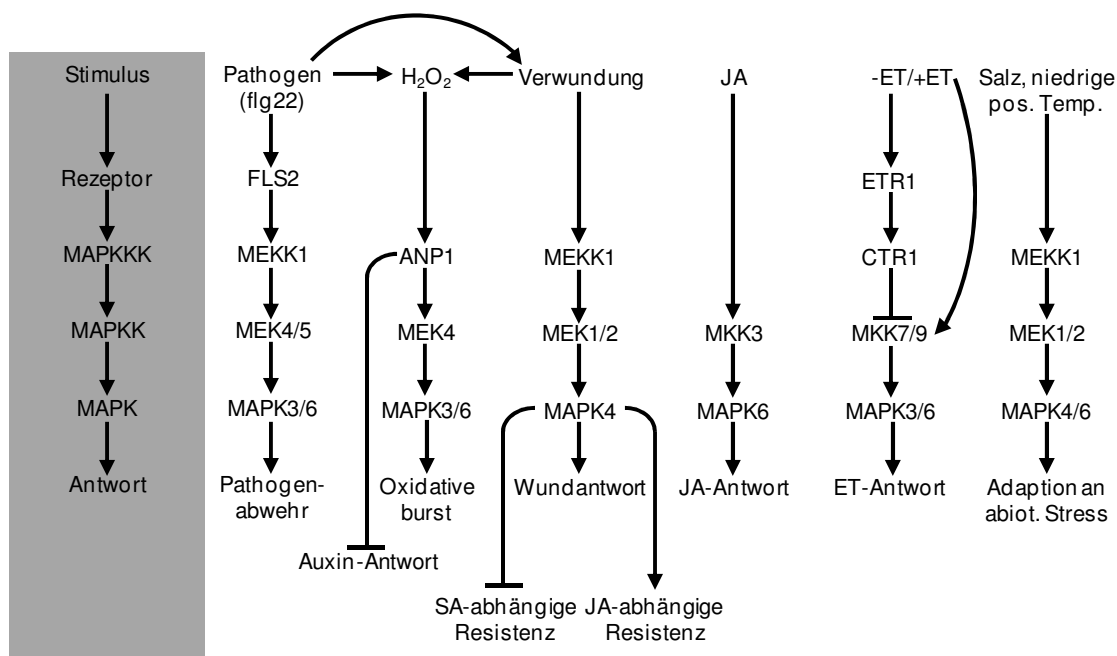


Abb. 1.7: MAPK-Signalwege in *Arabidopsis*, verändert nach Tena *et al.*, 2001

MAPK-Kaskaden bilden dynamische und überlappende Signaltransduktionswege mit vielen konvergenten und divergenten Routen. Das wirft die Frage auf, wie das hohe Level an Spezifität in Bezug auf Proteinaktivierung und –funktion aufrecht erhalten werden kann. Als

eine Möglichkeit wird diskutiert, dass die Interaktion zwischen den einzelnen Komponenten dieses Moduls Signal-abhängig ist. Es könnte auch sein, dass verschiedene MAPKKs unterschiedliche Substrat-Spezifitäten gegenüber ihren MAPKKs besitzen. Auch zusätzliche Stützproteine können beteiligt sein (Cardinale *et al.*, 2002). Es ist auch möglich, dass eine strikte Kontrolle der Proteinlokalisation oder der Lokalisation von Substratproteinen aufrecht erhalten wird (Lee *et al.*, 2004). Darüberhinaus wird angenommen, dass individuelle MAPKs unterschiedliche Aktivierungsspezifitäten (z.B. Dauer) besitzen, sobald sie durch MAPKKs aktiviert wurden (Cardinale *et al.*, 2002).

Bei der Untersuchung der mutualistischen Symbiose zwischen Pflanze und Pilz sind von den genannten MAP Kinasen MAPK3 und -6 von Interesse, da gezeigt werden konnte, dass sie in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen (Asai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Beide Proteine sind eng miteinander verwandt und besitzen bis zu einem gewissen Grad die selben Substrate (Feilner *et al.*, 2005). Sie werden beide posttranslational aktiviert. Auf Transkriptionsebene wird dagegen meist nur *MAPK3* reguliert (Hamel *et al.*, 2006).

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die mutualistische Interaktion zwischen dem Wachstumsfördernden Pilz *P. indica* und *Arabidopsis* auf der Seite der Pflanze zu untersuchen. Dazu sollte auf molekularer Ebene die Beteiligung der Proteine MATH1, MATH2, MATH3, PDK1.1, PDK1.2, MAPK3 und MAPK6 an der Interaktion untersucht werden.

MATH1 ist eng verwandt zu MATH2 und -3 (Kapitel 1.3.1) und wird in Gegenwart des Pilzes transient modifiziert (Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Es sind weder die Funktion, noch die Regulation oder die Lokalisation dieser MATH-Proteine bekannt. Sie sollten im Zuge dieser Arbeit hinsichtlich Regulation und Lokalisation charakterisiert werden. Es sollte zudem geklärt werden, ob sie untereinander redundant sind und wie diese drei Proteine zur Interaktion beitragen.

PDK1 wandelt Lipidsignale in davon abgeleitete Signale um. Bisher ist bekannt, dass PDK1.1 in einen Signalweg involviert ist, der Abwehrreaktionen nach Pathogenbefall hervorruft (Anthony *et al.*, 2004 und 2006). Es sollte ermittelt werden, ob PDK1.1 sowie das homologe Protein PDK1.2 ebenfalls eine Rolle in dieser mutualistischen Interaktion spielen. Es sollte außerdem geklärt werden, ob PDK1.1 und PDK1.2 funktionell redundant sind.

MAPK3 und -6 sind Mitglieder eines sehr alten, hoch konservierten und zentralen Regulationsmoduls, das eine Vielzahl von Zellreaktionen reguliert. Beide Proteine wurden

bisher in der Pathogenabwehr beschrieben. Ebenso wie für PDK1 sollte für diese beiden Kinasen geklärt werden, ob sie an der Interaktion mit dem Pilz beteiligt sind.

Folgende Punkte sollten analysiert werden:

- 1) Der zeitliche Verlauf der Interaktion im WT sollte charakterisiert werden.
- 2) Es sollten *knock-out* (*k.o.*)-Linien für die MATH-Proteine und für PDK1 hergestellt und die Mutanten charakterisiert werden.
- 3) Es sollte ermittelt werden, ob die Proteine MATH1, MATH2, MATH3, PDK1.1, PDK1.2, MAPK3 und MAPK6 entscheidend für die Interaktion mit dem Pilz sind und eine Inaktivierung der Proteine die Wachstumsreaktion auf den Pilz verhindert.
- 4) Anhand der *k.o.*-Linien sollte untersucht werden, ob die Proteine MATH1, MATH2, MATH3, PDK1.1, PDK1.2, MAPK3 und MAPK6 eine Rolle bei der Kolonisierung spielen.
- 5) Das zeitliche Expressionsmuster der genannten Proteine während der Interaktion sollte untersucht werden.
- 6) Es sollte geklärt werden, ob die MATH-Proteine Kalzium-abhängig reguliert sind.
- 7) Die MATH-Proteine sollte näher charakterisiert werden einschließlich ihrer subzellulären Lokalisation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Falls nicht explizit erwähnt wurden Chemikalien des Reinheitsgrades *p.a.* von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Biorad (München), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Merck (Darmstadt).

Zusätzlich wurden folgende spezielle Chemikalien verwendet: Gummi arabicum (Sigma, Taufkirchen), Chloralhydrat (Sigma, Taufkirchen), Coelenterazin (P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf), Dimethyl-Pimelinediimidat-Dihydrochlorid (DMP, Fisher Scientific, Nidderau), rec Protein A-Sepharose® 4B (Invitrogen, Karlsruhe).

Andere Verbrauchsmaterialien waren PVDF-Membranen (Peglab, Erlangen), Amicon® Ultra-15 *Centrifugal Filter Devices* (Millipore, Schwalbach), *PD-10 Columns* (GE Healthcare, Freiburg).

2.1.2 Enzyme

Taq DNA Polymerase	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Reverted Aid</i> Reverse Transkriptase	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>SYBR Green Mastermix</i>	BioRad, München
LR Clonase®	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, <i>New England Biolabs</i> , Frankfurt a.M.
Endo H _f	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt a.M.
Endo- α-N-Acetylgalactosamidase	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt a.M.
Neuraminidase	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt a.M.
Cellulase	Karlan, Cottonwood, USA
Macerozym	Karlan, Cottonwood, USA
Pectolyase	Sigma, Taufkirchen
Ribo Lock™ RNase Inhibitor	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

2.1.3 Molekulargewichtstandards für Nucleinsäuren und Proteine

DNA: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth)

Proteine: Precision Plus™ Standards, Dual Color (BioRad, München)

Wide Range, Molecular Weight 6,500 – 200,000 Da (Sigma, München)

2.1.4 Kits

<i>RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Gene JET™ Plasmid Mini Prep Kit</i>	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>High Fidelity PCR Mix</i>	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Qiaex II gel extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy® Plant Mini Kit (50)</i>	Qiagen, Hilden
<i>Omniscript® RT Kit (50)</i>	Qiagen, Hilden
<i>Ace Glow™ Ultrasensitive Chemiluminescence Substrate</i>	Peqlab, Erlangen
<i>pCR® 8/GW/TOPO® TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Gateway™ LR Clonase™ Enzyme Mix</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Invitrogen

2.1.5 Oligonucleotide

Tab. 2.1: T-DNA spezifische Oligonucleotide

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz
Lba1 (SALK)	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LBb1.3 (SALK)	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
Tag5_C (FLAG)	CAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
LB2_C (SAIL)	GCTTCCTATTATATCTTCCCA
LB3_C (SAIL)	TCATAACCAATCTCGATACAC
LP (pMAQ2)	ATGAAATATGGTGTGGAACTGATT
RP (pMAQ2)	GTTGTCTTGTCTCATCTCAACATC

Tab.2.2: Gen-spezifische Oligonucleotide

Atg-Nr.	5' - 3' Sequenz <i>forward</i>	5' - 3' Sequenz <i>reverse</i>
At3g20370	TACGATGGAGATCACTGCGA	GCCAGGCTTCATCATGTGTA
At3g20360	GGAATGATAACGTCAACGCC	CAAGTCTCACAGTGA CTCTC
At3g20380	CCTAAGGTCATGTCTGCAGA	CCACTTGGTTGAGGAAATGC
At5g04510	CAGTGCTCCTCCTACATCTT	GAAATCACTCACTGTGCAGC
At3g10540	GTGTGTGTGTTTGAAAGGCTG	GATGAGGTCTCTTGCTGCTTC

Tab. 2.3: cDNA-spezifische Oligonucleotide

Atg-Nr.	5' - 3' Sequenz <i>forward</i>	5' - 3' Sequenz <i>reverse</i>
At3g18780	GGTATTGTGCTGGATTCTGG	GATCCAGACACTGTACTTCC
At3g20360	CCACTCAGATATCATCACGT	CCTCCATAGCGACTTGAACA
At3g20380	TCATCACATCTTCGTCTGCG	CTAGGGTACCACTTGGTTGA
At5g04510	GCTGACTTCAGATGGACACA	TCTGAAGAGTCTCGATTGCC
At3g10540	CCGGGATTGTGAAACTCTTC	GAGACTTGAACGTTGAGGTC

Tab. 2.4: cDNA-spezifische Oligonucleotide für real time PCR (*Arabidopsis thaliana*)

Atg-Nr.	5' - 3' Sequenz <i>forward</i>	5' - 3' Sequenz <i>reverse</i>
At3g04120	GAGCTGACTACGTTGTTGAG	GGAGACAATGTCAAGGTCGG
At3g20370	GATGGAGTCTTTCAACACGC	CTGTCCGAGAGTTGAGTTGT
At3g20360	CCACTCAGATATCATCACGT	GTCCAGTTGTATCTACCGAC
At3g20380	CATCACTGCAGATCAAGTCG	GACATGACCTTAGGGAATCC
At5g04510	GTTGTGGATGCTCTTGAGTAT	TCGTCAGAAGCTGCATTAGG
At3g10540	AAACTAGCTCCAGATCCTGC	CTGTTGCCATCTTGAATCGAA
At3g25250	GTGAGTTTCGAGCAAGGAGT	GCCGCGTAAAATCTGATAATC
At3g45640	GACTGAGTATGTTGTTACGAG	GTGCCAAGCAACTCTGTCAA
At2g43790	GCATCGTTTGTTCGGCTATG	CGGGATAATATCTCTGATTGC
At1g55020	CAGCCATTTCAGTGAGTTTCT	GTGGAAGATAAGTCTTGTGG

Tab. 2.5: cDNA-spezifische Oligonucleotide für real time PCR (*Piriformospora indica*)

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz <i>forward</i>	5' - 3' Sequenz <i>reverse</i>
<i>Pitef1</i>	GAGCTGACTACGTTGTTGAG	GGAGACAATGTCAAGGTCGG

2.1.6 Antikörper

anti-H⁺ATPase-Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden]

anti-MATH1-Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden]

anti-MATH2-Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden]

anti-UGPase-Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden]

anti-VDAC1-Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden]

goat anti-(*rabbit* IgG), Peroxidase-gekoppelt [Sigma, München]

goat anti-(*rabbit* IgG) Ig mit 10 nm Gold [British Biocell International, Cardiff, UK]

Alexa[®]Fluor 488 [*goat* anti-(*rabbit* IgG), Invitrogen, Karlsruhe]

2.1.7 Pflanzenmaterial

WT: *Arabidopsis thaliana* (Col-0)

Tab. 2.9: Mutantenlinien, * INRA – *institute nationale de la recherche agriculture*, ** NASC – *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*

Gen	Atg-Nr.	Bezeichnung	Referenz
<i>MATH1</i>	At3g20370	FLAG_465CO2 T-DNA line	INRA*, France
<i>MATH2</i>	At3g20360	SALK_053238 T-DNA line	NASC** (UK)
<i>MATH3</i>	At3g20380	SALK_000431 T-DNA line	NASC** (UK)
<i>PDK1.1a</i>	At5g04510	SALK_113251 T-DNA line	NASC** (UK)
<i>PDK1.1b</i>	At5g04510	SALK_007800 T-DNA line	NASC** (UK)
<i>PDK1.2</i>	At3g10540	SAIL_450_B01 T-DNA line	NASC** (UK)
<i>MAPK3</i>	At3g45640	<i>fast insertion mutant</i> (γ rays)	B. Ellis (<i>University of British Columbia, Vancouver, Canada</i>)
<i>MAPK6</i>	At2g43790	SALK_127507 T-DNA line	NASC** (UK)

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung der Pflanzen

2.2.1.1 Wachstumsbedingungen von Pflanze und Pilz

Arabidopsis-Samen wurden oberflächensterilisiert und auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) in 90 mm Petrischalen ausgelegt. Zur Vorkeimung wurden die Samen 2 d im Dunkeln und 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie unter Dauerlicht bei 100 μ E/m²s und 21 °C wachsen gelassen.

P. indica wurde wie zuvor beschrieben (Varma *et al.*, 1999) auf Aspergillus-Minimalmedium, modifiziert nach Pham *et al.* (2004), kultiviert. Für festes Medium wurde 1% Agar zugegeben.

2.2.1.2 Isolation homozygoter *k.o.* Linien

Zur Isolation homozygoter *k.o.*-Linien wurde DNA aus einem Pool von Pflanzen einer T-DNA-Linie (Tab. 2.9) isoliert (Kapitel 2.2.2.1). In einer anschliessenden PCR wurde aus dieser DNA mit Hilfe von zwei verschiedenen Primer-Paaren nachgewiesen, welche der Pflanzen homozygot *k.o.*, heterozygot oder WT in Bezug auf ein bestimmtes Gen sind. Ein Primerpaar bestand dabei aus beiden Gen-spezifischen Primern (Tab. 2.2), das andere Primerpaar aus einem Gen-spezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer (Tab. 2.1).

Danach wurde aus den Pflanzen, die als homozygot *k.o.* identifiziert wurden, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.2.2) und in einer *Reverse Transcription* PCR mit Hilfe von

cDNA-spezifischen Primern (Tab. 2.3) untersucht, ob in diesen Pflanzen noch ein Transkript des inaktivierten Gens gebildet wird.

2.2.1.3 Kreuzung

Als Pollenrezipient wurde eine Pflanze mit vielen, noch ungeöffneten Blüten gewählt. Die Blüten wurden unter dem Binokular emaskuliert, so dass nur noch das Karpel übrig blieb. Als Pollendonor wurden die Antheren einer reifen Blüte von einer zu kreuzenden Pflanze verwendet. Die Antheren wurden so am Karpel abgetupft, dass Pollen am Stempel hängen blieben. Die gekreuzte Blüte wurde markiert. Die restlichen Blüten der rezipienten Pflanze wurden entfernt und die Pflanze anschließend unter Langtagbedingungen zur Reife gebracht.

2.2.1.4 Embryoletalitätsnachweis

Samen einer heterozygoten F1-Pflanze wurden zur Keimung gebracht und der Anteil gekeimter und nicht gekeimter Samen bestimmt. Die gekeimten Pflanzen wurden auf genomischer Ebene hinsichtlich des Anteils heterozygoter Pflanzen und WT bestimmt (s. Kapitel 2.2.1.2).

Um zu charakterisieren, in welchem Entwicklungsstadium die homozygoten *k.o.*-Samen beeinträchtigt sind, wurden die noch unreifen Samen in den Schoten einer heterozygoten Pflanze hinsichtlich eines auffälligen Phänotyps untersucht. Die Samen wurden in Hoyerscher Lösung (0,15 g Gummi arabicum (Sigma, Taufkirchen), 2 g Chloralhydrat, 0,1 ml Glycerin, 0,6 ml H₂O; Liu und Meinke, 1998) gebleicht und unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 125, Zeiss, Jena) analysiert.

2.2.1.5 Ko-Kultivierungsversuche und Bestimmung des Pflanzenwachstums

9 Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge wurden auf PNM-Medium (5 mM KNO₃, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 38 µM Fe-EDTA, 70 µM H₃BO₃, 14 µM MnCl₂, 0,5 µM CuSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0,2 µM Na₂MoO₄, 10 µM NaCl, 0,01 µM CoCl₂, 1,05 % Agar (Serva), 2,5 mM KH₂PO₄, pH 5.6) in 90 mm Petrischalen übertragen. Das Medium wurde zuvor mit einer Nylonmembran (Maschenweite 70 µm) belegt um zu verhindern, dass die Wurzeln in das Medium wachsen. Pro Petrischale wurde ein *Arabidopsis*-Keimling eingesetzt. Pilz-*Pluques* mit einem Durchmesser von etwa 5 mm wurden etwa 5 mm neben die Wurzelmitte überimpft. Nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen wurde die Frischmasse gewogen und das Wurzelmaterial für nachfolgende Transkriptionsanalysen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.6 Analyse der Kolonisierung

Für die direkte Sichtbarmachung von Pilzhyphen und Sporen wurden die Wurzeln ko-kultivierter Pflanzen unter dem Fluoreszenzmikroskop (TCS SP5 konfokalen Laserscanning-Mikroskop; Leica, Wetzlar) und unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 125; Zeiss, Jena) analysiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Wurzeln dabei bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und bei 500 – 550 nm detektiert. Für die Analyse unter dem Lichtmikroskop wurden die Sporen des Pilzes zuvor mit Säurefuchsin gefärbt. Dazu wurde das kolonisierte Wurzelmaterial 5 min in 10 % KOH bei 90 °C entfärbt, in Leitungswasser gewaschen, 5 min in 0,01 % Säurefuchsin gefärbt wieder in Leitungswasser gewaschen.

Zum indirekten Nachweis der Kolonisierung wurden die Wurzeln ko-kultivierter Pflanzen 8 mal sehr kräftig in Leitungswasser gewaschen. Aus diesem Material wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.2.2). In der anschliessenden *real time* PCR wurde der *P. indica elongation factor 1* (*Pitef1* (Tab. 2.5); Bütehorn *et al.*, 2000) daraus amplifiziert (Kapitel 2.2.2.4). Als Referenzgen wurde GAPC verwendet (Tab. 2.4).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA-Isolation

3-4 Blätter wurden in 500 µl Lysispuffer (7 M Harnstoff, 0,3 M NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 % Lauroylsarcosin, 20 mM EDTA pH 8,0) homogenisiert und 5 min bei 37 °C inkubiert. 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben. Danach wurden die Proben gevortext und 5 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube übertragen und das gleiche Volumen Isopropanol zugegeben. Die DNA wurde 5 min bei RT gefällt und die Proben 5 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 500 µl 80 % EtOH gewaschen. Anschließend wurden die Proben jeweils zentrifugiert und der EtOH quantitativ abgenommen. Das Präzipitat wurde getrocknet und in 50 µl aqua bidest gelöst.

2.2.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

RNA wurde mit dem *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. cDNA wurde mit dem *Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) aus der zuvor isolierten RNA umgeschrieben.

2.2.2.3 PCR-Protokol

Für eine PCR-Reaktion wurden 4,55 µl *aqua bidest*, 1 µl 10 x Puffer ((NH₄)₂SO₄), 0,8 µl Primer 1 (5 µM), 0,8 µl Primer 2 (5 µM), 0,8 µl 2 mM dNTPs, 0,8 µl 20 mM MgCl₂, 0,25 µl Taq DNA Polymerase (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon Rot) und 1 µl DNA zusammenpipettiert. Folgendes PCR-Programm wurde gestartet: 5 min 94°C, 30 sec 94°C, 30 sec 56°C, 90 sec 72°C, 7 min 72°C, 30 Zyklen, ∞ 4°C.

2.2.2.4 Real time PCR

Real time PCR wurde mit dem *iCycler iQ real time PCR detection system* und der *iCycler* Software-Version 2.2 (Biorad, München) durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-mRNA aus mindestens drei unabhängigen Replikaten von *Arabidopsis*-Wurzeln, die in den Ko-Kultivierungsexperimenten geerntet wurden, isoliert (Kapitel 2.2.2.2). Die Amplifikation mit dem *SYBR Green Supermix* (Biorad, München) erfolgte nach den Herstellerangaben in einem Endvolumen von 25 µl. Die entsprechenden Primerpaare sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet: initiale Denaturierung 2 min 94 °C; 30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C, 40 sec 72 °C (40 Zyklen); finale Extension 10 min 72 °C. Es wurden jeweils Doppelproben amplifiziert. Die Zu- bzw. Abnahme der Induktion der Genexpression wurde als relative Zu- oder Abnahme bezogen auf GAPC als Referenzgen mit der delta-delta-Ct-Methode berechnet.

2.2.3 Ca²⁺-Messungen

Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen (*Col 0*), die das cytosolische Apoaequorin exprimierten, wurden für die Ca²⁺-Messungen verwendet (Knight *et al.*, 1996). Die Pflanzen wurden vertikal auf Hoagland's Medium mit 1% Agar für 14 Tage kultiviert. Für die Ca²⁺-Messungen wurden die Wurzeln abgeschnitten und über Nacht bei RT in 5 µM Coelenterazin (P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf) zur Rekonstitution des Apoaequorins inkubiert. Die Lumineszenzimpulse, die am darauffolgenden Tag während der Messung mit einem Mikroplatten-Luminometer erhalten wurden (*Luminoscan Ascent*, version 2.4, Thermo Fischer Scientific), wurden entsprechend der Berechnung von Rentel *et al.* (2004) berechnet.

2.2.4 Herstellung eines Zellwandextrakts (ZWE) von *P. indica*

Ein ZWE von *P. indica* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Anderson-Prouty und Albersheim (1975) hergestellt. Das Mycel einer 14 Tage alten Flüssigkultur von *P. indica* wurde mit Mörser und Pistill in je 5 ml Wasser pro g Mycelium homogenisiert. Das

Homogenat wurde durch einen grobkörnigen Glasrichter gefiltert. Der Rest wurde dreimal mit Wasser, einmal mit Chloroform/MetOH (1:1) und einmal mit Aceton gewaschen. Die Präparation wurde zwei Stunden Luft-getrocknet und das pilzliche Zellwandmaterial eingedickt. Das Zellwandmaterial wurde in Wasser resuspendiert (1 g ZWE in 100 ml Wasser) und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Durch das Autoklavieren wurde die aktive Fraktion freigesetzt. Die Suspension wurde 10 min bei 14000 g zentrifugiert, sterilfiltriert und auf die Hälfte des Volumens reduziert (Vadassery *et al.*, 2009).

2.2.5 Protoplastenisolation

2.2.5.1 Protoplastenisolation aus *Arabidopsis*-Blättern

Arabidopsis-Blätter wurden in 2–5 mm grosse Stücke geschnitten und mit der Blattunterseite für mindestens 8 h in Enzymlösung (1 % Zellulase (Karlan, Deutschland), 0,26 % Macerozym (Karlan, Deutschland), 0,4 M Mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES pH 5,7, 10 mM CaCl₂, 0,1 % BSA) gelegt. Die Lösung wurde zusammen mit den restlichen Blattbestandteilen durch eine Nylonmembran (70 µm Maschenweite) gefiltert und 1–2 min bei 4 °C und 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in kalter W5-Lösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES) resuspendiert und 1 min bei 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederholt in kalter W5-Lösung resuspendiert und für mindestens 6 h auf Eis inkubiert. Die Probe wurde 1 min bei 100 g zentrifugiert und in kalter MMg-Lösung (0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES) resuspendiert.

2.2.5.2 Protoplastenisolation aus *Arabidopsis*-Wurzeln

Arabidopsis-Wurzeln wurden in 2–5 mm lange Stücke geschnitten und für 30 – 50 min bei 28 °C in Enzymlösung (1,5 % (w/v) Zellulase, 0,1 % Pectolyase, 0,1 % BSA, 10 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM MES/KOH, pH 6,0, 280 mOsM mit Sorbitol) vorsichtig geschwenkt (60 rpm). Die Lösung wurde zusammen mit den verbliebenen Wurzelstücken durch eine Nylonmembran (70 µm Maschenweite) gefiltert und 10 min bei 4 °C und 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in kaltem CaCl₂-Puffer (1 mM CaCl₂, 5 mM MES, 280 mOsM mit Sorbitol, pH 6,0) resuspendiert. Zentrifugation und Resuspendieren wurden noch einmal wiederholt.

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Gesamtproteinisolation

Die Wurzeln von 2 - 4 Wochen-alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff gemörsernt und in 2xProteinextraktionspuffer (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 30 % Saccharose, 40 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen. Die Proben wurden gekühlt, Ultraschall-behandelt, 5 min bei 75 °C erhitzt und kurz bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues *Tube* übertragen und die Proteinkonzentration mit dem RC/DC Protein Assay Kit (Biorad, München) bestimmt.

2.2.6.2 Zellfraktionierung

Arabidopsis WT-Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen in 90 mm Petrischalen auf MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962) angezogen. Nach 3–4 Wochen wurden die Pflanzen geerntet und die Sprosse von den Wurzeln getrennt. Beides wurde separat voneinander in einem *Waring Blender* in Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 330 mM Sorbitol, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3 mM EDTA, 1,5 mM DTT, 1 mM PMSF) homogenisiert. Die Suspensionen wurden durch eine Nylonmembran (Maschenweite 70 µm) gefiltert und 20 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall SS34). Die Pellets wurden in 2xProteinextraktionspuffer (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 30 % Saccharose, 40 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und als “Organellenfraktion” bezeichnet. Die Überstände wurden 4 h bei 4°C und 100000 g zentrifugiert (Beckman Ti). Die Pellets wurden in K-Pi-Puffer (330 mM Saccharose, 3 mM KCl, 5 mM K-Pi pH 7,8) resuspendiert und als “Mikrosomenfraktion” bezeichnet. Der verbleibende Überstand wurde als “cytosolische Fraktion” bezeichnet. Alle erhaltenen Fraktionen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.6.3 Isolation von Plasmamembranen

Plasmamembranen wurden aus zuvor isolierten Mikrosomenfraktionen (Kapitel 2.2.6.2) isoliert. Dazu wurden die bei -20 °C aufbewahrten Mikrosomenfraktionen (Kapitel 2.2.6.2) aus mehreren Isolationen vereint und mittels 2-Phasen-Trennung daraus die Plasmamembranen isoliert. Bei dieser Methode werden die verschiedenen Zellmembranen aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften durch zwei Polymere, Polyethylenglykol (PEG) und Dextran (Dx), zu denen sie unterschiedliche Affinitäten besitzen, voneinander getrennt. Dazu wurden mehrere 6,4 % ige 2-Phasen-Systeme (11,52 g 20 % (w/w) Dextran T-500; 5,76 g 40 % PEG 3350; 5,94 ml 43 % (w/w) Saccharose; 0,675 ml 0,2 M KPi pH 7,8; 0,041 ml KCl;

mit aqua dest auf 27 g) hergestellt. Auf diese 2-Phasen-Systeme wurden jeweils 9 g der Mikrosomenpräparation in K-Pi-Puffer gegeben, die Proben sofort 25 x invertiert und anschließend 10 min bei 4 °C und 1500 g zentrifugiert (Sorvall, HB-6). Danach bildeten sich zwei Phasen, eine obere PEG-haltige und eine untere Dx-haltige. Die obere PEG-Phase wurde quantitativ abgenommen und erneut auf ein vorbereitetes 2-Phasen-System gegeben. Die Proben wurden wieder invertiert und zentrifugiert. Nach zwei oder drei Phasentrennungen sollten nahezu alle Plasmamembranen in der oberen PEG-Phase sein. Die Plasmamembranen in der PEG-Phase wurden 1 h bei 4 °C zentrifugiert (Beckman Ti) und in TED-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 3 mM EDTA, 1 mM DTT) resuspendiert. Zur Auflösung der Membranen wurde Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben und die Proben 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem RC/DC Protein Assay Kit (Biorad, München) bestimmt. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.2.6.4 Herstellung von Antikörpern gegen MATH1 und MATH2

Antikörper wurden gegen synthetische Peptide, deren Sequenzen mit denen jeweils einer MATH-Domäne aus MATH1 und MATH2 entsprachen, in Kaninchen hergestellt. Die Peptidsequenzen waren (NH₂-) CPIDTFKDPTKGYL (-CONH₂) für MATH1 und (NH₂-) CPQELLKAKPYDKV (-CONH₂) für MATH2. Pro Antikörperherstellung wurden zwei Kaninchen verwendet. Die Kaninchen wurden dreimal (MATH2) bzw. viermal (MATH1) immunisiert und die Seren mittels Western blot getestet.

2.2.6.5 Peptide Competition Assay

Auf eine hydrophobe PVDF-Membran wurde der Gesamtproteinextrakt von *Arabidopsis* über eine sehr breite Spur geblottet und diese Spur nach dem Blocken in drei Streifen geschnitten. Diese Membanstreifen sollten im Nachhinein mit Antikörpern markiert werden, die zuvor mit unterschiedlichen Mengen an überschüssigem Peptid (50-fach, 100-fach bzw. kein Peptid als Negativkontrolle) inkubiert werden sollten, gegen die sie hergestellt wurden. Die entsprechenden Peptidmengen wurden wie folgt berechnet:

$$(1) \quad \mu\text{l Peptid} / \text{Blot} = \frac{\text{mol AK} * \text{Verhältnis Peptid:AK} * \text{MW Peptid}}{\text{Peptidkonzentration} * 1000 * 1000}$$

$$(2) \quad \text{mol AK} = \frac{\text{IgG-Konzentration} * 100000}{\text{MW1/2 AK} * (\text{AK-Verdünnung} * \text{Lösungsvolumen} * 1000)}$$

MW $\frac{1}{2}$ AK = 75000 g/mol; IgG-Konzentration = 10mg/ml; Lösungsvolumen (1xTBST mit 2% Milch) = 10 ml; AK-Verdünnung = 1:1000; Verhältnis Peptid:AK = 0, 50 und 100; Peptidkonzentration = 2 mg/ml

Die Pepide wurden in *aqua bidest* zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst und die entsprechenden Volumen mit 1:500 verdünntem anti-MATH1 AK [*goat anti-(rabbit IgG)*, Agrisera, Schweden) bzw. 1:500 verdünntem anti-MATH2 AK [*goat anti-(rabbit IgG)*, Agrisera, Schweden) 2 h bei RT in 1xTBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5) unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die Lösungen wurden danach 1:1 mit 1xTBST verdünnt. 2% Milch wurden zugegeben, die Peptid-AK-Lösungen auf die zuvor vorbereiteten Membranstreifen gegeben und die Signale detektiert.

2.2.6.6 Western blot

10 % Trenngel

16,7 ml Acrylamid
18,80 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
13,92 ml *aqua bidest*
250 μ l 20 % SDS
300 μ l 10 % APS
30 μ l TEMED

Sammelgel

3,75 ml Acrylamid
2,5 ml 0,3 M Tris-HCl pH 6,8
13,52 ml *aqua bidest*
100 μ l 20 % SDS
120 μ l 10 % APS
12 μ l TEMED

10 – 100 μ g Protein wurden auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und getrennt. Die Proteine im Gel wurden *semi-dry* auf eine hydrophobe PVDF-Membran (Peqlab, Erlangen) geblottet und die Membran anschliessend 1 h bei RT in 1xTBST mit 2 % Milch geblockt. Der erste AK wurde über Nacht bei 4 °C in 1xTBST mit 2 % Milch inkubiert. Die Membran wurde dreimal in 1xTBST gewaschen und mit dem zweiten AK 1 h bei RT in 1xTBST mit 2 % Milch markiert. Die Membran wurde zweimal in 1xTBST und einmal in 1xTBS gewaschen. Die Signale wurden anschliessend detektiert (Für ECL: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarinsäure, 50 mM H₂O₂, 100 mM Tris-HCl pH 8,5).

2.2.6.7 Endoglykosidaseverdau

Proteine wurden aus *Arabidopsis*-Wurzeln isoliert (Kapitel 2.2.7.2) und mit Endoglykosidasen behandelt, um Zuckerketten von Glycoproteinen zu entfernen. Zur Entfernung von N-gebundenen Zuckerresten wurden die Proteine dabei mit Endo H_f (*New England Biolabs*, Frankfurt a.M.) entsprechend der Herstelleranleitung verdaut. Zur

Entfernung von O-gebundenen Zuckerresten wurden die Proteine mit Endo- α -N-acetylgalactosamidase (*New England Biolabs*, Frankfurt a.M.), die mit Neuraminidase (*New England Biolabs*, Frankfurt a.M.) kombiniert wurde, entsprechend der Herstelleranleitung verdaut. Im Anschluss wurde ein Western blot durchgeführt (Kapitel 2.2.7.6).

2.2.6.8 Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie

Isolierte Protoplasten (Kapitel 2.2.5.1 und 2.2.5.2) wurden zwischen 0,1 mm dicke Kupferprofile eingebettet und innerhalb von Millisekunden durch Eintauchen in flüssiges Propan, das durch flüssigen Stickstoff gekühlt wurde, eingeforen. Die Proben wurden in einer BAT400T Gefrierbrucheinheit (BAL-TEC, Liechtenstein) bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ fraktioniert. Von diesen Fraktionen wurden Replikate hergestellt, indem die Proben mit einer 2-2,5 nm Pt/C-Schicht in einem Winkel von 35° beschattet und anschliessend mit einer Kohlenstoff-Schicht ($\sim 20\text{ nm}$) rechtwinklig bedampft wurden. Die Dicke der Platin-Schicht wurde durch einen Dünnschicht-Quarzkristall-Monitor kontrolliert, die Dicke der Kohlenstoff-Schicht wurde optisch kontrolliert.

Anschliessend wurden die Replikate 16-20 h mit Aufschluss-Lösung (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 % (w/v) SDS, 30 mM Saccharose) behandelt, um verbliebene Zellbestandteile zu entfernen (Fujimoto, 1995). Die Replikate wurden dann viermal in NaCl/P_i (75 mM NaCl, 12,5 mM NaH₂PO₄, 67 mM Na₂HPO₄, pH 7,2) gewaschen und 30 min in Tropfen aus 1 % BSA in NaCl/P_i geblockt. Zur Markierung mit dem ersten Antikörper wurden die Replikate zuerst auf Tropfen aus 0,1 % BSA in NaCl/P_i und dann auf Tropfen aus 0,5 % BSA in NaCl/P_i mit 1:50 verdünntem anti-MATH1 Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden] bzw. mit 1:50 verdünntem anti-MATH2 Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden] platziert und 1 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden viermal in NaCl/P_i gewaschen und 1 h bei RT mit dem 1:50 verdünnten Gold-konjugierten zweiten Antikörper [*goat* anti-(*rabbit* IgG) Ig mit 10 nm Gold, British Biocell International, Cardiff, UK] in NaCl/P_i mit 0,5 % BSA markiert. Die Replikate wurden mehrfach in NaCl/P_i gewaschen, 10 min bei RT in 0,5 % (w/v) Glutaraldehyd in NaCl/P_i fixiert, mehrfach mit destilliertem Wasser gespült, auf Formvar-bedeckte Gitter montiert und unter einem EM 902 Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert.

2.2.6.9 Fluoreszenzmikroskopie

Arabidopsis-Wurzeln sowie Protoplasten aus Blättern und Wurzeln wurden nach Antikörper-Markierung (gegen MATH1 und MATH2) unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Arabidopsis-Protoplasten wurden wie zuvor beschrieben isoliert (Kapitel 2.2.5.1 und 2.2.5.2). *Arabidopsis*-Wurzeln wurden 1-2 h in Enzymlösung (1,5 % (w/v) Zellulase, 0,1 % Pectolyase, 0,1 % BSA, 10 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM MES/KOH, pH 6,0, 280 mOsM mit Sorbitol) präinkubiert, um die Zellwand durchlässig für die Antikörper zu machen, und anschliessend in CaCl₂-Puffer (1 mM CaCl₂, 5 mM MES, 280 mOsM mit Sorbitol, pH 6,0) gewaschen.

Während der darauffolgenden Antikörper-Markierung wurden die Wurzeln sowie auch die Wurzelprotoplasten immer in CaCl₂-Puffer, die Blattprotoplasten immer in MMg-Lösung (0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES) behandelt.

Die Proben wurden zuerst 1 h bei RT in 2 % Milch geblockt und über Nacht bei 4 °C in 2 % Milch mit dem 1:1000 verdünnten primären anti-MATH1 Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden] bzw. mit dem 1:500 verdünnten primären anti-MATH2 Antikörper [anti-(*rabbit* IgG), Agrisera, Schweden] markiert. Die Proben wurden dreimal 5 min gewaschen und 1 h bei RT mit dem zweiten, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (Alexa[®] Fluor 488 [*goat* anti-(*rabbit* IgG), Invitrogen, Karlsruhe] in 2 % Milch markiert. Die Proben wurden gewaschen und unter dem TCS SP5 konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop (Leica, Wetzlar) analysiert. Dabei wurde für die Wurzeln das HCX PL APO CS 20x0x0.70 DRY UV-Objektiv verwendet und die Wurzeln bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 500 – 625 nm detektiert. Für die Protoplasten wurde das HCX PL APO lambda blue 63.0x140 OIL UV-Objektiv verwendet. Angeregt wurden die Proben ebenfalls bei 488 nm und das Fluoreszenzsignal des Antikörpers bei 500 – 550 nm (grüner Kanal) detektiert. Die Autofluoreszenz der Blattprotoplasten (Chlorophyll) wurde bei 600 – 765 nm (roter Kanal) aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation homozygoter *k.o.*-Linien und Mutantencharakterisierung

In der FLAG_465CO2 T-DNA-Linie wurde nach homozygoten *k.o.*-Pflanzen für MATH1 gesucht. Von insgesamt 318 Samen sind 266 (74,21 %) gekeimt. Die Pflanzen waren entweder WT-Pflanzen oder heterozygot. Homozygote *k.o.*-Pflanzen haben sich unter den gekeimten Pflanzen nicht befunden. Entsprechend Mendels Spaltungsgesetz liess das vermuten, dass eine homozygote Mutation von *MATH1* embryonal ist. Somit konnte die Rolle von MATH1 in *Arabidopsis* in der Interaktion mit *P. indica* mittels homozygoter *k.o.*-Pflanzen nicht untersucht werden.

Die nicht-gekeimten Samen wurden in Hoyerscher Lösung gebleicht, um sie unter dem Lichtmikroskop zu analysieren. In diesen Samen konnten entweder reife Embryos, degenerierte Anlagen oder leere Samenhüllen gefunden werden (Abb 3.1). Im Gegensatz dazu konnte während der Analyse der noch unreifen Samen, die sich noch in den Schoten befanden, kein auffälliger Phänotyp gefunden werden. Das liess vermuten, dass homozygote *MATH1*-Embryos zwar reife Samen bilden, aber nicht mehr keimen können.



Abb.3.1: Nicht gekeimte Samen der *MATH1* *k.o.* Linie. Die Samen wurden mit Hoyerscher Lösung gebleicht und unter dem Lichtmikroskop analysiert.

Für MATH2 und MATH3 konnten homozygote *k.o.*-Pflanzen erhalten werden. Dies wurde zuerst auf genomischer Ebene untersucht und anschliessend auf Transkriptebene mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 3.2). Zusätzlich konnte für die *MATH2* *k.o.*-Linie gezeigt werden, dass das MATH2-Protein sich in einem Western blot nicht mehr nachweisen lässt (Abb. 3.3). Der Antikörper gegen MATH2 wurde im Verlauf dieser Arbeit entwickelt (Kapitel 3.4).

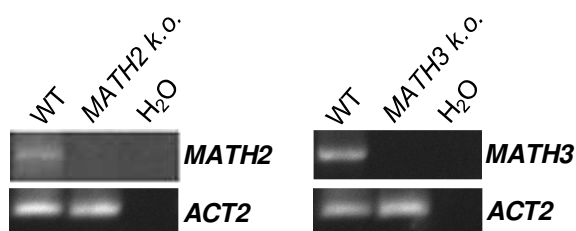


Abb. 3.2: Nachweis von *MATH2*- bzw. *MATH3*- Transkripten in *MATH2* und *MATH3* *k.o.*-Pflanzen und WT mittels RT-PCR. *MATH2* konnte im WT, aber nicht in der *MATH2* *k.o.*-Mutante amplifiziert werden. *MATH3* konnte im WT, aber nicht in der *MATH3* *k.o.*-Mutante amplifiziert werden. *Actin2* (*ACT2*) diente in beiden Linien als Positivkontrolle.

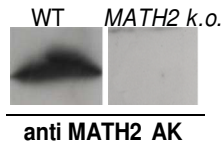


Abb. 3.3: Western blot mit Antikörper gegen MATH2 im WT und in der *MATH2 k.o.*-Mutante MATH2 konnte im WT aber nicht in der *MATH2 k.o.*-Linie nachgewiesen werden.

Phänotypisch zeigten beide Mutanten bei 2 – 3 Wochen alten Keimlingen ein signifikant höheres Verhältnis der Biomasse Spross:Wurzel als der WT (t-Test, $p < 0,001$ bei *MATH2 k.o.* und $p < 0,05$ bei *MATH3 k.o.*; Abb. 3.4). Dieser Effekt war bei *MATH2 k.o.* stärker als bei *MATH3 k.o.*.

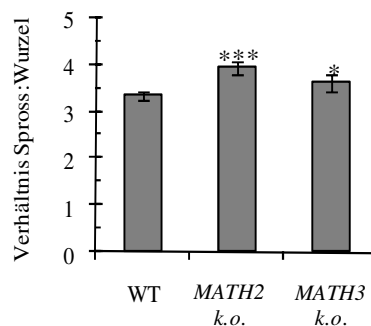


Abb. 3.4: Biomasseverhältnis Spross:Wurzel im WT im Vergleich zur *MATH2* und *MATH3 k.o.*-Linie. Dargestellt sind die Mittelwerte von 56 (WT), 12 (*MATH2*) und 5 (*MATH3*) Messungen. Während einer Messung sind je 3-10 Pflanzen gewogen worden. Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Die Mutanten unterscheiden sich signifikant vom WT (t-Test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Homozygote *MATH2*- und *MATH3 k.o.*-Pflanzen wurden gekreuzt, um eine Doppel-*k.o.*-Mutante herzustellen. In der F₂-Generation sind 50 % der Samen gekeimt. Die Pflanzen waren entweder homozygot für nur ein Merkmal, heterozygot für nur ein Merkmal, heterozygot für beide Merkmale oder hatten einen WT-Genotyp. Doppel-*k.o.*-Mutanten oder Mutanten, die homozygot für ein Merkmal und heterozygot für das andere Merkmal waren, waren nicht dabei (Tab. 3.1). Das liess vermuten, dass Mutanten der letzten beiden Genotypen embryonal sein könnten. Dabei scheint es unerheblich zu sein, welche der beiden Merkmale dabei heterozygot bzw. homozygot sind.

Tab. 3.1: Genotypische Verteilung der gekeimten F₂-Pflanzen der *MATH2 k.o.* x *MATH3 k.o.* gekreuzten Linie. *MATH2*, *MATH3* – WT-Allel; *math2*, *math3* – Mutanten-Allel

Allele	<i>MATH2</i>	<i>MATH2</i>	<i>MATH2</i>	<i>MATH2</i>	<i>math2</i>	<i>MATH2</i>	<i>MATH2</i>	<i>math2</i>	<i>math2</i>
	<i>MATH2</i>	<i>MATH2</i>	<i>math2</i>	<i>MATH2</i>	<i>math2</i>	<i>math2</i>	<i>math2</i>	<i>math2</i>	<i>math2</i>
	<i>MATH3</i>	<i>MATH3</i>	<i>MATH3</i>	<i>math3</i>	<i>MATH3</i>	<i>MATH3</i>	<i>math3</i>	<i>MATH3</i>	<i>math3</i>
	<i>MATH3</i>	<i>math3</i>	<i>MATH3</i>	<i>math3</i>	<i>MATH3</i>	<i>math3</i>	<i>math3</i>	<i>math3</i>	<i>math3</i>
Häufigkeit	1,29 %	3,58 %	9,59 %	13,67 %	11,58 %	60,38 %	-	-	-

Die nicht gekeimten Samen wurden wieder gebleicht und unter dem Lichtmikroskop analysiert (Abb. 3.5). Der Phänotyp dieser Samen war ähnlich dem der *MATH1 k.o.*-Mutante.

Es konnten wieder Embryosrukturen mit zwei Kotyledonen und einem Hypokotyl erkannt werden, die diesmal jedoch trocken und farblos aussahen. Offensichtlich kann kein reifer Embryo angelegt werden.

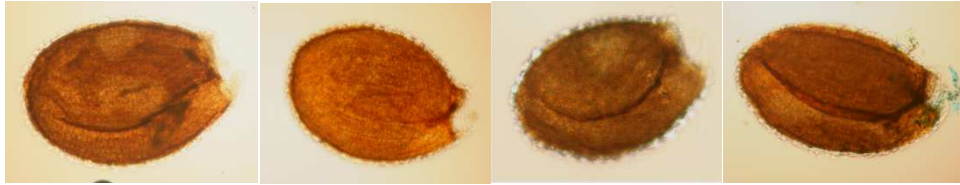


Abb. 3.5: Nicht gekeimte Samen der F2-Generation der *MATH2 k.o.* x *MATH3 k.o.*-Kreuzung. Die Samen wurden in Hoyerscher Lösung gebleicht und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Die Embryos liessen eine normale Grundstruktur mit zwei Kotyledonen und einer Achse erkennen, sahen jedoch trocken und farblos aus.

Für PDK1 gibt es zwei homologe Gene im *Arabidopsis*-Genom, *PDK1.1* und *PDK1.2*., mit einer Sequenzhomologie von 92 % auf genomischer Ebene. Für beide Gene konnten homozygote *k.o.*-Pflanzen erhalten werden, die keinen Phänotyp zeigten. Für *PDK1.1* standen dabei 2 T-DNA-Linien zur Verfügung, so dass zwei verschiedene *k.o.*-Linien hergestellt werden konnten (*PDK1.1a* und *PDK1.1b*). Die *PDK1.1* und *PDK1.2 k.o.*-Linien wurden anschliessend zur Herstellung einer Doppel-*k.o.*-Mutante gekreuzt (Abb. 3.6).

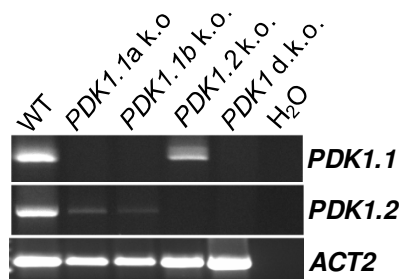


Abb. 3.6: Nachweis von *PDK1.1*- und *PDK1.2*- Transkripten im WT und den verschiedenen *k.o.*-Linien für *PDK1* mittels RT-PCR. *PDK1.1* wurde im WT und in der *PDK1.2 k.o.*-Linie, aber nicht in den *PDK1.1 k.o.*-Linien und der *PDK1.1xPDK1.2* Doppel-*k.o.*-Linie amplifiziert. *PDK1.2* wurde im WT und in den *PDK1.1 k.o.*-Linien, aber nicht in der *PDK1.2 k.o.*-Linie und der *PDK1.1xPDK1.2* Doppel-*k.o.*-Linie amplifiziert. *Actin2* (*ACT2*) diente in allen Linien als Positivkontrolle.

Im Gegensatz zu den beiden singulären *k.o.*-Linien zeigte die *PDK1* Doppel-*k.o.* (*d.k.o.*)-Mutante einen phänotypischen Unterschied zum WT. Während verschiedener Entwicklungsstadien konnte ein signifikant verringertes Wachstum festgestellt werden. Das Wachstum war dabei jeweils um 20 – 25 % im Vergleich zum WT reduziert (Abb. 3.7a und b).

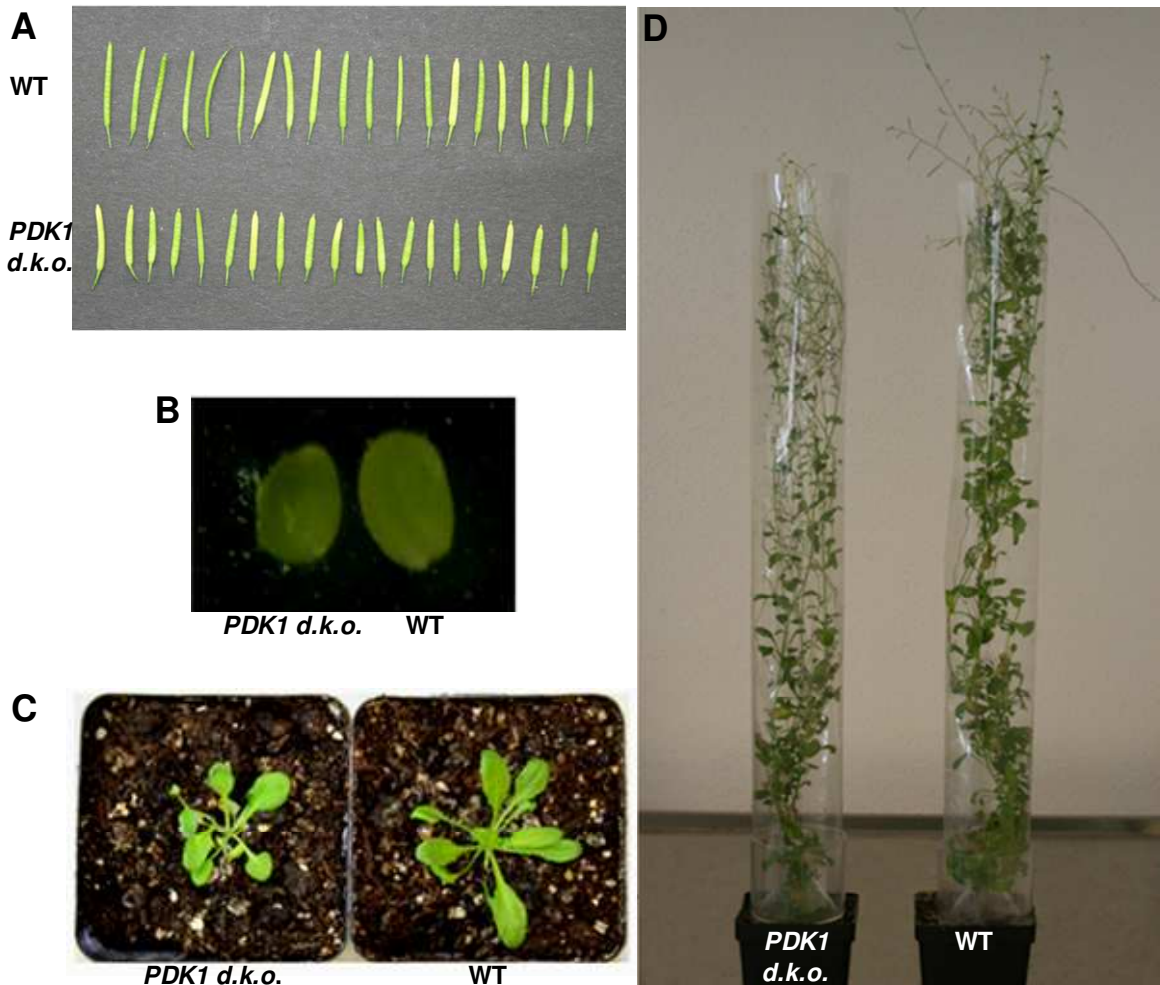


Abb. 3.7 a: Phänotyp der *PDK1 d.k.o.*-Mutante im Vergleich zum WT. A) relative Schotenlänge. B) Grösse noch unreifer Samen. C) 4 Wochen alte Keimlinge auf Erde. D) reife Pflanze.

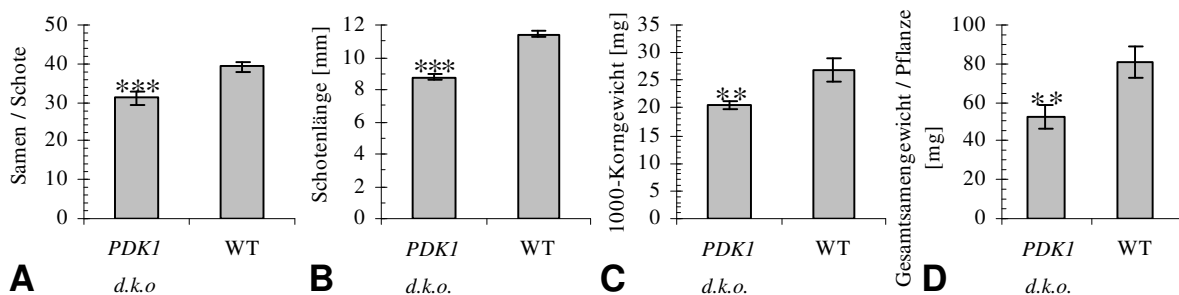


Abb. 3.7 b: Numerischer Unterschied von *PDK1 d.k.o.*-Pflanzen im Pflanzenwachstum während verschiedener Entwicklungsstadien im Vergleich zum WT. Dargestellt sind die Mittelwerte von 10 – 20 Pflanzenteilen verschiedener Pflanzen (A und B) bzw. Einzelmessungen (C und D). Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Das Wachstum der Mutante unterscheidet sich signifikant vom WT (t-Test, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$).

Die *MAPK6 k.o.*-Linie wurde von Dr. Lee (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt und ist bereits beschrieben. Im Verlauf der Arbeit ist jedoch ein noch nicht beschriebenes Merkmal dieser Mutante aufgefallen, das hier kurz benannt wird: Das Verhältnis der Biomasse von

Spross:Wurzel ist bei dieser Mutante um 25,1 % kleiner ($2,6 \pm 0,16$) als beim WT ($3,47 \pm 0,13$) (Abb. 3.8).

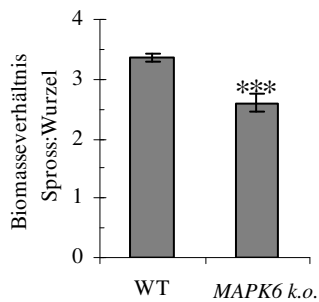


Abb. 3.8: Biomasseverhältnis Spross:Wurzel im WT und der *MAPK6* k.o.-Linie. Dargestellt sind die Mittelwerte von 56 (WT) bzw. 21 (*MAPK6*) Pflanzen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Die Mutante unterscheidet sich signifikant vom WT (t-Test, *** $p < 0,001$).

3.2 Ko-Kultivierungsversuche

Neun Tage alte WT- als auch Mutanten-Keimlinge von *Arabidopsis* wurden mit *P. indica* auf Phosphatmangelmedium ko-kultiviert. Dabei wurde jeweils eine Pflanze, entweder WT oder Mutante, auf eine Petrischale gesetzt und der Pilz auf diese Platte überimpft. Parallel dazu wurde die gleiche Anzahl Pflanzen ohne Pilz als Kontrolle kultiviert (Abb. 3.9).



Abb. 3.9: *Arabidopsis*-Pflanzen ohne (links) und mit (rechts) *P. indica*

Pro Versuch wurden immer Mutanten- und WT-Pflanzen parallel angezogen und getestet. Die Ko-Kultivierung wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt. Um den Zeitverlauf der Interaktion zu untersuchen, wurden während der Zeit der Ko-Kultivierung regelmässig, d.h. alle zwei Tage, Proben genommen und die Biomasse (Spross und Wurzel separat) bestimmt. Dabei wurden zu jedem Zeitpunkt und für jede Linie immer 10 Pflanzen mit und 10 Pflanzen ohne Pilz gewogen und daraus die Mittelwerte berechnet.

Eine Biomassezunahme war sowohl in den Sprossen als auch in den Wurzeln zu erkennen. In den folgenden Graphiken ist immer die Wurzelbiomasse angegeben, da vor allem die Wurzeln für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen wurden.

3.2.1 Wachstumsantworten des WT bei Ko-Kultivierung mit *P. indica*

Im WT macht sich ein Wachstums-fördernder Effekt ab 4 Tagen nach Start der Ko-Kultivierung bemerkbar. Er nimmt bis zu 8 Tagen nach Inokulation immer weiter zu. Nach 8

Tagen erreicht das Pflanzenwachstum ein Plateau (Abb. 3.10). Eine weitere Biomassezunahme ist vermutlich durch die Kultivierung in den Petrischalen limitiert.

Das Spross:Wurzel-Biomasseverhältnis liegt im verwendeten System zwischen 3,3 und 3,5. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass dieses Verhältnis 4 Tage nach Inokulation bei den Pflanzen mit Pilz transient um etwa 25 % signifikant kleiner ist als bei Pflanzen ohne Pilz (t-Test, $p < 0,05$; Abb. 3.11). Zu den darauffolgenden Zeitpunkten war das Verhältnis Spross:Wurzel zwischen Pflanzen mit und ohne Pilz gleich. Das bedeutet, dass der Anteil der Wurzel relativ zum Spross durch den Pilz 4 Tage nach Inokulation transient höher ist als im Vergleich zur Kontrolle (Pflanzen ohne Pilz) und sich die Verschiebung dieses Verhältnisses danach wieder ausgleicht.

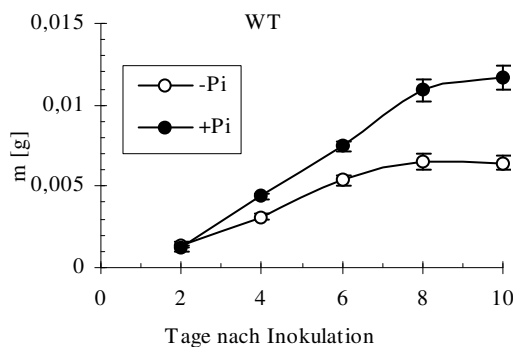


Abb. 3.10: Ko-Kultivierung von *Arabidopsis* WT-Keimlingen mit *P. indica* auf Phosphat-Mangelmedium in Petrischalen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomassezunahme in den Wurzeln von 13 unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

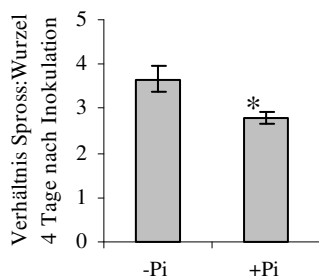


Abb. 3.11: Biomasseverhältnis Spross:Wurzel beim WT 4 Tage nach Inokulation mit *P. indica* im Vergleich zur Kontrolle (ohne Pilz). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Die Werte der Pflanzen mit Pilz unterscheiden sich dabei signifikant von den Werten der Pflanzen ohne Pilz (t-Test, * $p < 0,05$).

Somit können anhand der Daten dieser Arbeit für den untersuchten Zeitraum der Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* in diesem experimentellen System drei Phasen unterschieden werden, die durch die beschriebenen Veränderungen im Wachstumsverhalten der Pflanzen voneinander abgegrenzt werden:

- 1) Sobald Pflanze und Pilz ko-kultiviert werden, müssen sie zunächst Signale aussenden und sich erkennen. Diese Phase wurde deshalb als Erkennungsphase bezeichnet. Sie wird zeitlich durch die Verschiebung des Biomasseverhältnisses Spross:Wurzel 4 Tage nach Inokulation begrenzt.

- 2) Durch die Verschiebung des Biomasseverhältnisses Spross:Wurzel 4 Tage nach Inokulation kann davon ausgegangen werden, dass zu diesem Zeitpunkt der eigentliche Start der Etablierung der symbiotischen Interaktion einsetzt. In der darauffolgenden Zeit bis 8 Tage nach Inokulation steigt die Wachstumszunahme durch den Pilz stetig. Diese Phase wurde deshalb als Etablierungsphase bezeichnet.
- 3) In der darauffolgenden Phase (ab 8 Tagen) findet keine weitere Biomassezunahme und folglich keine Wachstumsförderung durch den Pilz mehr statt. Diese Phase wurde deshalb als eigentliche Interaktionsphase dieser Symbiose bezeichnet.

Die Unterteilung dieser drei Phasen beruht somit auf den Veränderungen der Biomasse als Parameter für die Reaktion der Pflanze auf den Pilz.

Obwohl *P. indica* als mutualistischer Pilz für *Arabidopsis* beschrieben wurde (Varma *et al.*, 1999; Varma *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2003; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004), resultierten beim WT nicht alle Ko-Kultivierungsversuche in einer erhöhten Biomasseproduktion. Bei einigen Versuchen gab es keinen Unterschied zwischen Pflanzen, die mit dem Pilz ko-kultiviert wurden und Pflanzen, die in Abwesenheit des Pilzes gewachsen sind (Abb. 3.12 A). In anderen Fällen schien der Pilz das Wachstum der Pflanzen sogar zu inhibieren (Abb. 3.12 B). Die Versuche wurden immer identisch durchgeführt. Somit können diese unterschiedlichen Ausgänge der Ko-Kultivierungen anhand der vorliegenden Daten nicht erklärt werden (s. Diskussion).

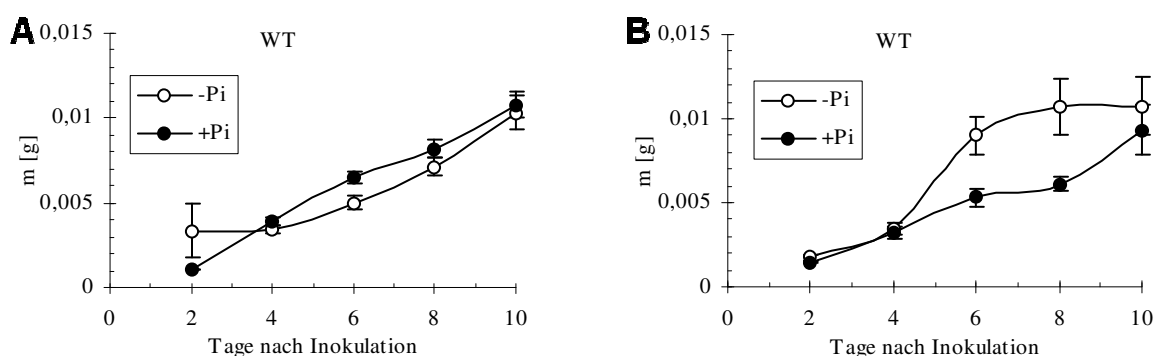


Abb. 3.12: Ko-Kultivierung von *Arabidopsis*-WT-Keimlingen mit *P. indica*, wenn die Pflanzen (A) keine Wachstumsantwort zeigten oder (B) der Pilz das Wachstum inhibierte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 9 (A) bzw. 3 (B) unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

Insgesamt resultierten 55,6 % der durchgeführten Ko-Kultivierungsversuche beim WT in einer gesteigerten Wachstumsrate, bei 33,3 % der Versuche reagierten die Pflanzen nicht

mehr auf den Pilz und bei 11,1 % der Versuche war eine Wachstumsinhibition zu beobachten (Abb. 3.13).

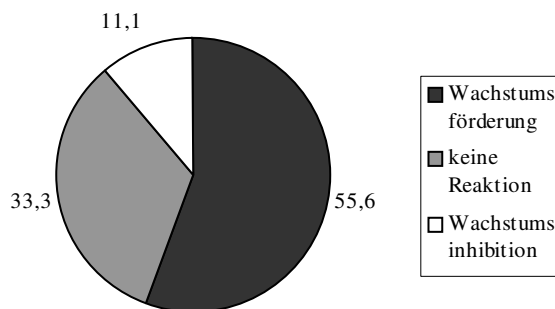


Abb. 3.13: Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse aus den Ko-Kultivierungsexperimenten beim WT in % unterteilt in Wachstumsförderung, keine Antwort und Wachstumsinhibition.

3.2.2 Wachstumsantworten der Mutanten während der Ko-Kultivierung mit *P. indica*

Reaktionen der Mutanten bei Wachstumsförderung im WT

Der Fokus dieser Arbeit bezog sich auf die mutualistische Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica*, bei der das Wachstum der Pflanzen (WT) durch den Pilz gefördert wird. Daher werden im Folgenden die Reaktionen der *k.o.*-Linien *MATH2*, *MATH3*, *PDK1.1a*, *PDK1.1b*, *PDK1.2*, *PDK1 (d.k.o.)*, *MAPK3* und *MAPK6* auf den Pilz gezeigt (Abb. 3.14), bei denen der WT parallel dazu eine gesteigerte Wachstumsrate zeigte.

In der Bilanz reagierte die *MATH2 k.o.*-Linie nicht mehr auf den Pilz. Bei der genauen Betrachtung der einzelnen Kinetiken konnte jedoch beobachtet werden, dass die *MATH2 k.o.*-Linie vor allem dann nicht auf den Pilz reagierte, wenn der Wachstums-fördernde Effekt beim WT stark war. Wenn die Wachstumsförderung beim WT dagegen eher schwach war, haben die *MATH2 k.o.*-Pflanzen genauso wie der WT mit leichter Wachstumssteigerung reagiert.

Die *MATH3 k.o.*-Linie reagierte nicht mehr auf den Pilz bei einer positiven Wachstumsförderung beim WT.

Die singulären *k.o.* Linien für *PDK1*, *PDK1.1a*, *PDK1.1b*, und *PDK1.2*, reagierten genauso wie der WT mit Wachstumsförderung. Die *PDK1 d.k.o.*-Linie reagierte im Durchschnitt ebenfalls auf den Pilz und zeigte keinen Unterschied zum WT. In den einzelnen Ko-Kultivierungsversuchen konnte jedoch bei der *d.k.o.*-Mutante beobachtet werden, dass die Mutante im Vergleich zum WT eine grössere Variation in ihrer Antwort zeigte – entweder reagierte sie deutlich stärker als der WT oder weniger oder gar nicht.

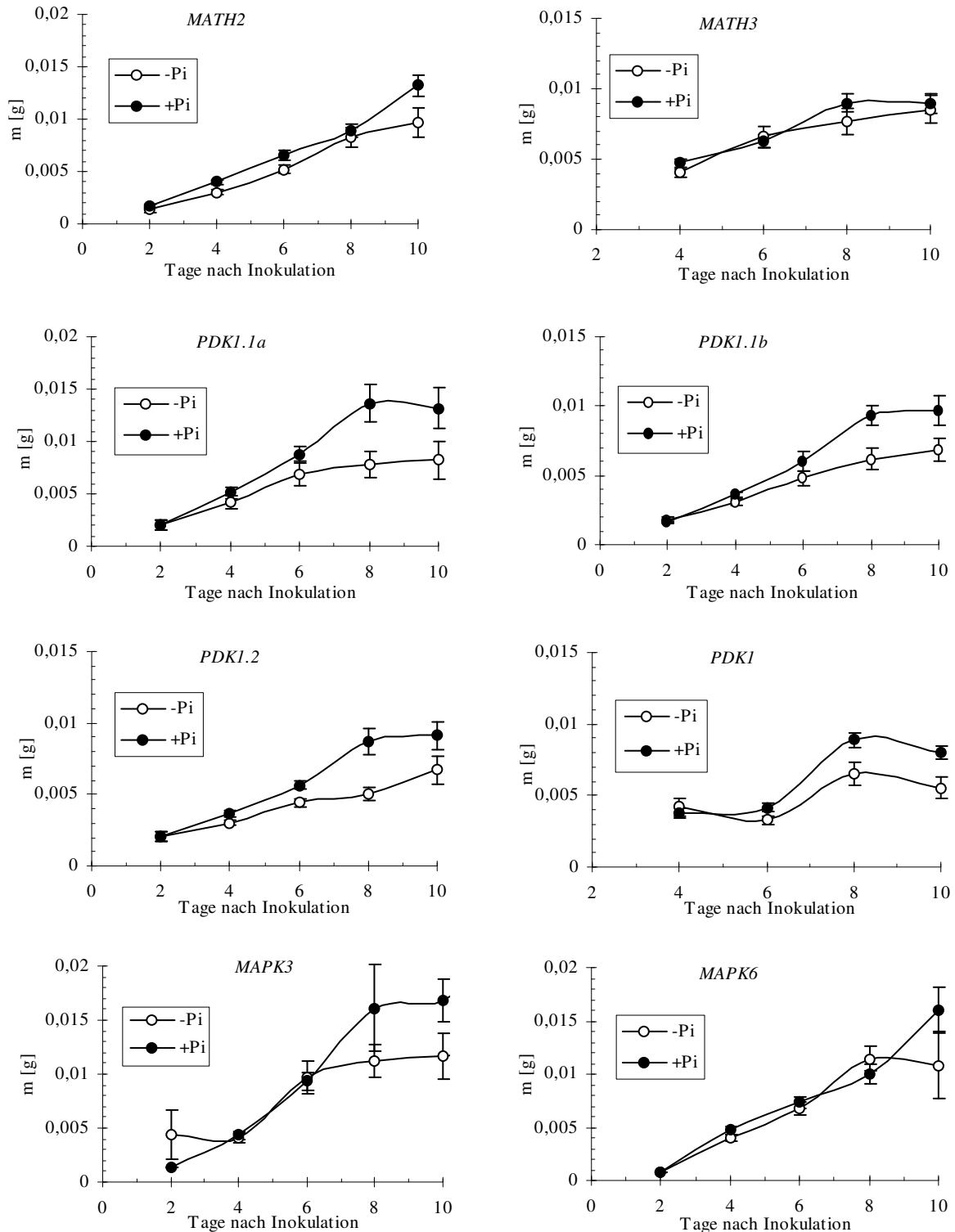


Abb. 3.14: Wachstumsantworten der *k.o.*-Linien während der Ko-Kultivierung mit *P. indica* auf Phosphatmangelmedium in Petrischalen, wenn der Pilz parallel dazu beim WT Wachstumssteigerung hervorrief. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomassezunahme in den Wurzeln von 4 (*MATH2*, *PDK1*, *MAPK6*), 3 (*MATH3*, *PDK1.1a*, *PDK1.1b*), 5 (*PDK1.2*) und 2 (*MAPK3*) unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

Es stellte sich heraus, dass die *PDK1 d.k.o.*-Mutante stärker als der WT reagierte, wenn der WT mit mehr als 110 % Wachstumsförderung reagierte. Wenn der Wachstumszuwachs beim

WT unter diesem Wert lag, reagierte die Mutante weniger als der WT oder gar nicht, wenn der WT selbst mit weniger als 80 % Wachstumsförderung reagierte.

Bei der *MAPK3 k.o.*-Linie konnte eine verzögerte Biomassezunahme im Vergleich zum WT beobachtet werden. Die *MAPK6 k.o.*-Linie reagierte dagegen gar nicht mehr. Bei der *MAPK6 k.o.*-Linie fällt darüberhinaus auf, dass die Wurzelbiomasse relativ hoch ist, was vermutlich auf den Phänotyp dieser Mutante zurückzuführen ist (Kapitel 3.1.3). Obwohl diese Mutante nicht mehr auf den Pilz reagierte, verschob sich das transiente Verhältnis der Biomasse Spross:Wurzel 4 Tage nach Inokulation sogar stärker als beim WT (Abb. 3.15), was vermutlich ebenfalls dem Phänotyp dieser Mutante zugeschrieben werden kann.

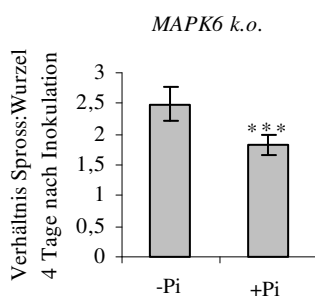


Abb. 3.15: Biomasseverhältnis Spross:Wurzel bei der *MAPK6 k.o.*-Mutante 4 Tage nach Inokulation mit *P. indica* im Vergleich zur Kontrolle (ohne Pilz). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Die Werte der Pflanzen mit Pilz unterscheiden sich dabei signifikant von den Werten der Pflanzen ohne Pilz (t-Test, *** $p < 0,001$).

Zusätzlich sollte der *k.o.*-Effekt der *MAPK3* und *MAPK6 k.o.*-Linie komplementiert werden. Damit sollte untersucht werden, ob der Unterschied zum WT in der Antwort auf den Pilz spezifisch für die Interaktion ist oder ob der Effekt unspezifisch ist und durch die Inaktivierung des betreffenden Gens verursacht wurde, der zu einer geringeren Pflanzenfitness führen könnte. Dazu wurden je zwei komplementierte (*tap-getaggte*) Linien für die *MAPK3* und *MAPK6 k.o.*-Linie von Dr. Lee (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt. Es zeigte sich, dass keine der beiden komplementierten Linien für *MAPK3* den *k.o.*-Effekt aufheben konnte und eine frühere Wachstumsförderung durch den Pilz zeigte (Abb. Anhang 5). Bei der verzögerten Reaktion dieser Mutante auf den Pilz handelt es sich folglich um einen unspezifischen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte eine der beiden *tap-getagkten* Linien für *MAPK6* den Effekt der Inaktivierung des Gens komplementieren und reagierte mit einer leichten Wachstumsförderung (Abb. Anhang 5). Daraus wurde abgeleitet, dass MAPK6, aber nicht MAPK3 entscheidend für die Wachstumsantwort auf den Pilz ist.

Reaktionen der Mutanten, wenn beim WT keine Wachstumsförderung beobachtet wurde

Während Wachstumsförderung die vorwiegende Reaktion des WT bei Ko-Kultivierung mit *P. indica* ist, umfasst das Spektrum der Antworten von *Arabidopsis* auch keine

Wachstumsreaktion auf den Pilz oder Wachstumsinhibition. Im Folgenden sind die Reaktionen der Mutanten beschrieben, wenn beim WT entweder keine Reaktion oder Wachstumsinhibition zu beobachten war.

Die *MATH2 k.o.*-Mutante reagierte einmal mit Wachstumsförderung und einmal nicht auf den Pilz, wenn beim WT eine Wachstumsinhibition zu beobachten war (Abb. 3.16.) Insgesamt reagierte die Mutante demnach mit einer positiveren Wachstumsrate als der WT, wenn der WT negativ reagierte. Zusammen mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen zu dieser Mutante könnte das darauf hindeuten, dass das Verhältnis zwischen WT und *MATH2 k.o.*-Mutante in Bezug auf die Interaktion mit *P. indica* reziprok ist.

Die *MATH3 k.o.*-Mutante zeigte Wachstumsförderung 8 und 10 Tage nach Inokulation, wenn der WT nicht auf den Pilz reagierte (Abb. 3.17) Sie reagierte damit ebenfalls positiver auf den Pilz als der WT, wenn beim WT keine Wachstumsförderung durch *P. indica* beobachtet werden konnte. Somit scheint sich auch die *MATH3 k.o.*-Mutante reziprok zum WT in der Antwort auf den Pilz zu verhalten.

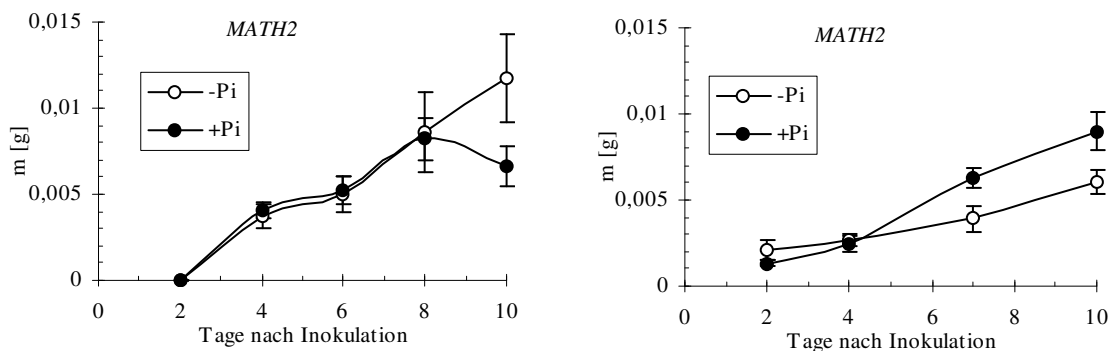


Abb. 3.16: Wachstumsreaktionen der *MATH2 k.o.*-Mutante auf *P. indica*, wenn beim WT Wachstumsinhibition zu beobachten war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomasse der Wurzeln je eines Versuchs. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

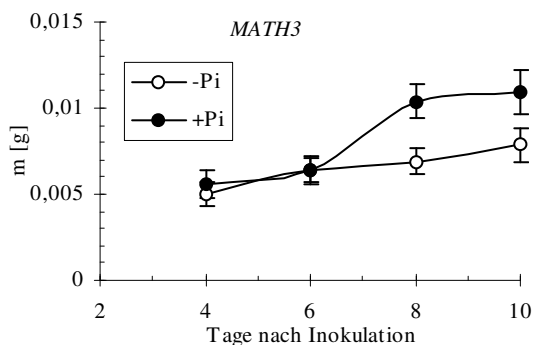


Abb. 3.17: Wachstumsreaktionen der *MATH3 k.o.*-Mutante auf *P. indica*, wenn der WT nicht reagierte. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomasse der Wurzeln aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

Bei den *PDK1 k.o.*-Mutanten (*PDK1.1a k.o.*, *PDK1.1b k.o.*, *PDK1.2 k.o.*, *PDK1d.k.o.*) sowie auch bei der *MAPK6 k.o.*-Mutante änderte sich die Aussage, die zuvor beschrieben wurde, nicht. Das heisst für die *PDK1 k.o.*-Mutanten, dass sie immer wie der WT reagierten. Sie zeigten demnach keine Reaktion auf den Pilz, wenn der WT nicht reagierte bzw. Wachstumsinhibition, wenn beim WT das Wachstum durch den Pilz inhibiert wurde. Dagegen reagierte die *MAPK6 k.o.*-Mutante in keinem Fall auf den Pilz; unabhängig davon, ob der WT parallel dazu positiv auf den Pilz reagierte oder nicht oder ob er negativ reagierte.

3.2.3 Kolonisierungsversuche beim WT und den Mutanten

Die Wachstumssteigerung bei *Arabidopsis* durch *P. indica* geht mit einer Kolonisierung der Wurzeln durch den Pilz und seiner Sporenbildung einher. Der Pilz kann die Wurzeln entweder intrazellulär oder extrazellulär kolonisieren (Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Varma *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob die Mutanten, die zuvor in den Ko-Kultivierungsversuchen getestet wurden (Kapitel 3.2.2 – 3.2.3), sich in ihrem Grad der Kolonisierung durch *P. indica* vom WT unterscheiden, wurden pilzliche Bestandteile wie Hyphen oder Sporen innerhalb der Wurzeln nachgewiesen und mit dem WT verglichen.

Kolonisierung kann entweder durch direkte Sichtbarmachung unter dem Mikroskop oder indirekt durch z.B. Amplifizierung pilzlicher DNA oder RNA durch PCR nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden beide Ansätze angewandt.

Zur direkten Sichtbarmachung unter dem Mikroskop wurden Pflanzen verwendet, die mindestens 20 Tage oder mehr mit dem Pilz ko-kultiviert waren. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich das Pilzmycel bereits gut um die Wurzeln entwickelt. Zu früheren Zeitpunkten der Interaktion ist die Kolonisierung meist lokal noch zu begrenzt und daher schwieriger nachweisbar. Ko-kultivierte Wurzeln wurden zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und bei 500 – 550 nm detektiert (Abb. 3.18 A). Darüberhinaus wurden die Sporen des Pilzes mit Säurefuchsin gefärbt und unter dem Lichtmikroskop analysiert (Abb. 3.18 B). Mit beiden Methoden sind pilzliche Bestandteile – entweder Hyphen und Sporen oder nur Sporen – deutlich nachweisbar. Es liess sich jedoch nicht klar erkennen, ob sich die pilzlichen Bestandteile dabei in der Wurzel oder ausserhalb befanden. Daher konnte der Grad der Kolonisierung innerhalb der Wurzeln mikroskopisch nicht quantifiziert werden. Eine Quantifizierung der Kolonisierungsrate wurde deshalb mittels *real time* PCR durchgeführt.

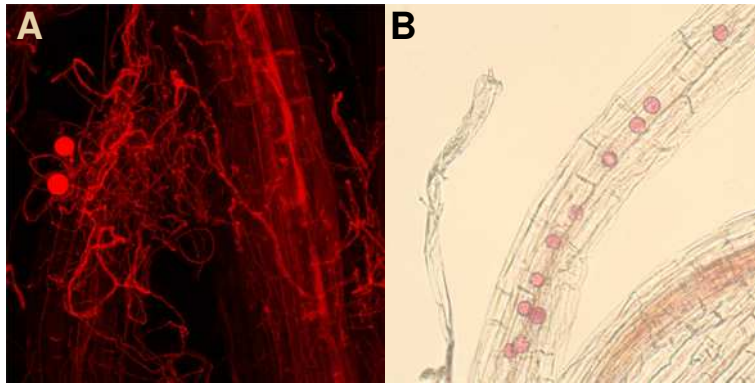


Abb. 3.18: Mikroskopische Aufnahmen von mit *P. indica* kolonisierten WT-Wurzeln von *Arabidopsis* A) Mikroskopische Aufnahme unter dem Fluoreszenzmikroskop. Wurzeln und Mycel wurden bei 488 nm angeregt und bei 500 – 550 nm detektiert. Auf der linken Seite sind zwei Sporen zu sehen. B) Lichtmikroskopische Aufnahme von *Arabidopsis*-Wurzeln und Pilzsporen. Die Sporen wurden zuvor mit Säurefuchsin gefärbt.

Der *P. indica elongation factor 1* (*Pitef1*), ein *P. indica*-spezifisches Markergen mit einer hohen Transkriptionsrate (Büthorn *et al.*, 2000), wurde als Marker für den Kolonisierungsgrad verwendet. Die Wurzeln 15 Tage ko-kultivierter WT- und Mutanten-Pflanzen wurden sehr gründlich in Wasser gewaschen, RNA aus den Wurzeln isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der anschließenden *real time* PCR *Pitef1* amplifiziert. Als Referenzgen wurde *GAPC* amplifiziert. Die Daten der *k.o.* Linien wurden dabei jeweils gegen den WT normalisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.19 aufgezeigt. Alle Mutanten werden weniger durch den Pilz kolonisiert als der WT. *MATH2 k.o.* und *MAPK3 k.o.* zeigten dabei die niedrigste Kolonisierungsrate. Bei *MAPK6* ist die Kolonisierungsrate durch den Pilz am wenigsten beeinträchtigt gegenüber den anderen Mutanten.

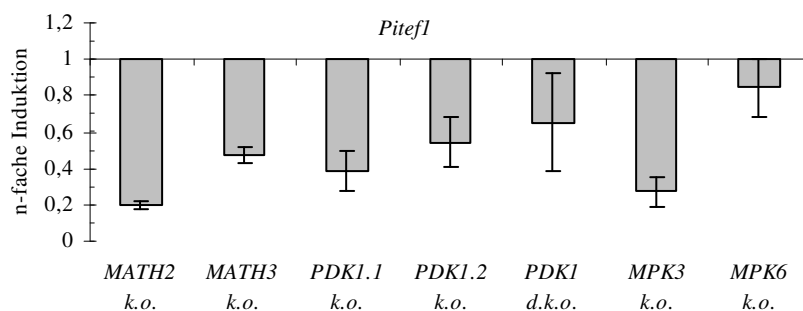


Abb. 3.19: Amplifikation von *Pitef1* aus der cDNA der *k.o.*-Linien in *real time* PCR. Die Werte wurden gegen die des WT normalisiert und zeigen damit den Kolonisierungsgrad gegenüber dem WT an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

3.2.4 Expressionsanalyse

Es wurde die Regulation der Genexpression von *MATH1*, *MATH2*, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3* und *MAPK6* während der Interaktion mit *P. indica* untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von *OXII* (*oxidative burst dependent kinase 1*), dessen Genprodukt ein Substrat von PDK1.1 nach Pathogenbefall ist (Anthony *et al.*, 2004 und 2006), und *LOX1* (*Lipoxygenase 1*), die für ein Abwehrgen kodiert (Porta-Rocha und Sosa, 2002), untersucht.

Die Expression wurde im WT analysiert. Dabei wurden mindestens drei unabhängige Versuche getestet, bei denen der Pilz eine Wachstumsförderung bei den Pflanzen hervorrief. Um darüberhinaus zu untersuchen, ob die Expression dieser Gene mit dem Ausgang einer Ko-Kultivierung zusammenhängt, wurde zusätzlich ein Versuch analysiert, bei dem der WT nicht mehr auf den Pilz reagierte und ein bis zwei Versuche, bei dem die Pflanzen durch den Pilz kleiner wurden.

Für die Genexpressionanalysen wurde die RNA aus den Wurzeln isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression durch *real time* PCR untersucht. Es zeigte sich, dass das Expressionsmuster von *MATH1*, *MATH2*, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3*, *MAPK6* und *OXII* nicht mit dem Ausgang der Interaktion zusammenhängen und folglich nicht darüber entscheiden, ob die Pflanzen durch den Pilz grösser werden, nicht mehr reagieren, oder kleiner werden. Die Werte wurden deshalb pro Zeitpunkt alle zusammengefasst. Als reguliert wurden Gene betrachtet, deren Expressionslevel sich mindestens um den Faktor 2 änderten. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.20 aufgezeigt.

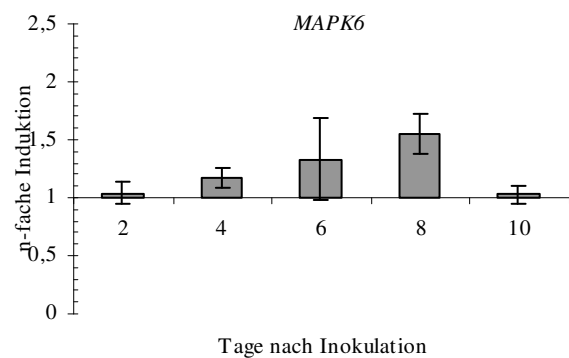
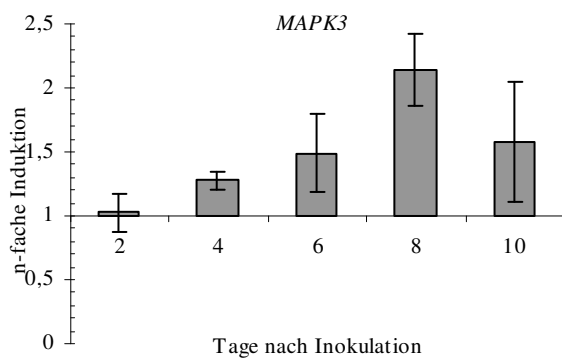
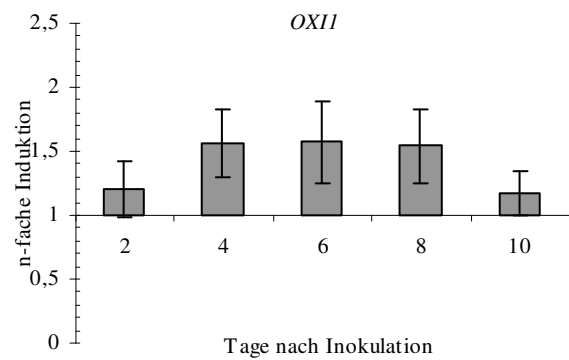
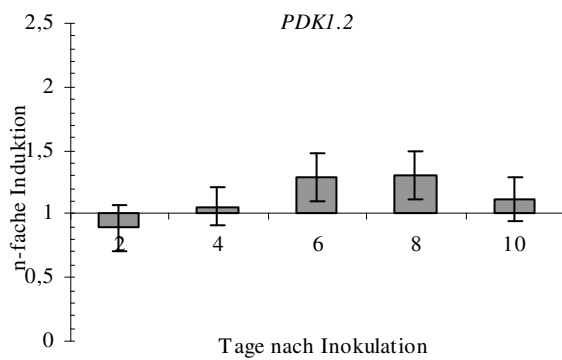
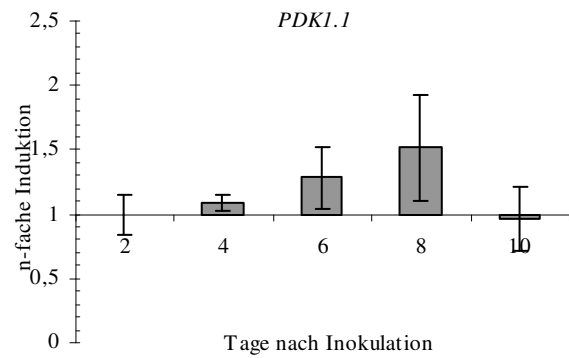
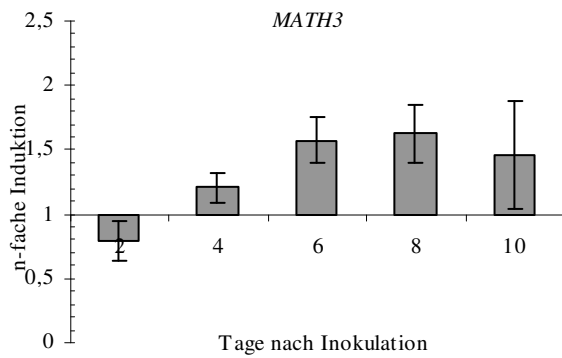
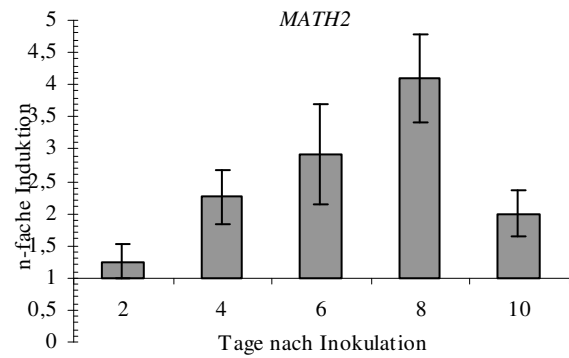
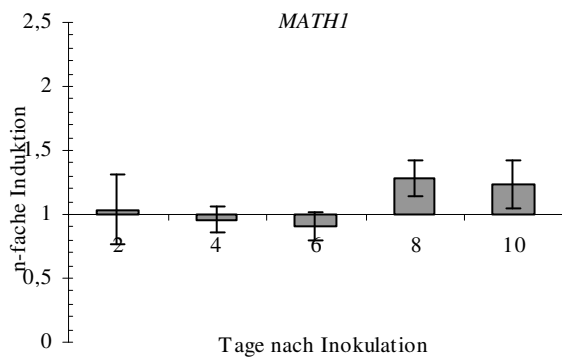
MATH1, ein sehr stark exprimiertes Gen in *Arabidopsis*, wurde während der Ko-Kultivierung mit *P. indica* nicht reguliert. Lediglich konnte eine sehr schwache Abnahme von 4 bis 6 Tagen nach Inokulation und eine darauffolgende leichte Zunahme des mRNA-Gehalts beobachtet werden.

MATH2, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3* und *MAPK6* zeigten im Verlauf der Ko-Kultivierung mit *P. indica* qualitativ das gleiche Expressionsmuster. Der mRNA-Gehalt dieser Gene begann 4 Tage nach Inokulation anzusteigen und erreichte 8 Tage nach Inokulation sein Maximum. Anschliessend (10 Tage nach Inokulation) nahm der mRNA-Gehalt wieder ab. *MATH2* und *MAPK3* zeigten eine Änderung der Genexpression um mehr als Faktor zwei und sind damit deutlich reguliert. *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2* und *MAPK6* sind trotz des gleichen Expressionsmusters wie *MATH2* und *MAPK3* nicht bzw. nur schwach reguliert.

OXII wurde 4, 6 und 8 Tage nach Inokulation zwar schwach hochreguliert, gilt aber ebenfalls als nicht reguliert.

LOX1 zeigte eine starke Hochregulation 4 Tage nach Inokulation und eine langsame Abnahme dieser Hochregulation während der darauffolgenden Zeitpunkte. Diese Hochregulation konnte nur beobachtet werden, wenn die Pflanzen mit Wachstumssteigerung auf *P. indica* reagierten. *LOX1* wurde nicht reguliert, wenn die Pflanzen nicht mehr auf den Pilz reagierten oder das Wachstum der Pflanzen durch den Pilz beeinträchtigt wurde. Gezeigt

sind deshalb nur die Werte aus den vorangegangenen Ko-Kultivierungsversuchen, bei denen im WT Wachstumsförderung bei Ko-Kultivierung mit *P. indica* beobachtet wurde.



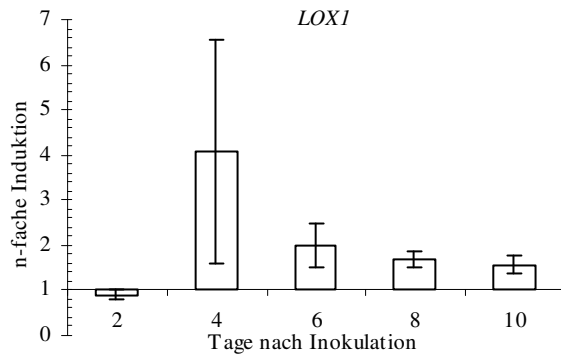


Abb. 3.20: Zeitliches Expressionsmuster von *Arabidopsis*-Genen im WT während der Interaktion mit *P. indica*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5-6 unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

3.3 Rolle von MATH2 und MATH3 bei der *P. indica*-induzierten cytosolischen Ca^{2+} -Erhöhung

Kalzium ist ein universeller sekundärer Botenstoff für Signalprozesse in Zellreaktionen. Die Freisetzung z.B. ins Cytosol ist einer der ersten Vorgänge, der innerhalb von Sekunden oder Minuten nach Signalperzeption abläuft. Vadassery *et al.* (2009) konnten zeigen, dass ein Zellwandextrakt (ZWE) von *P. indica* zu einem cytosolischen Ca^{2+} -Einstrom bei *Arabidopsis* führt. Dazu wurden transgene *Aequorin*-Linien verwendet. *Aequorin* ist ein Apoenzym aus *Aequorea aequorea*, das mit Coelenterazin rekonstituiert werden kann. Es wird daraufhin biolumineszent und dient als Indikator für einen cytosolischen Kalzium-Einstrom ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) nach Stimulus-Aktivierung. Die Biolumineszenzsignale werden mit einem digitalen Luminometer aufgezeichnet.

Um zu untersuchen, ob MATH2 und MATH3 für den *P. indica*-induzierten Ca^{2+} -Einstrom benötigt werden, wurden die *MATH2* bzw. *MATH3* *k.o.*-Linie in die transgene *Aequorin*-Linie eingekreuzt und die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signale in den Wurzeln nach Zugabe des ZWE gemessen.

In Abb. 3.21 ist das Ergebnis einer solchen Messung exemplarisch für den WT gezeigt. Dabei wird durch Zugabe des ZWE zu Beginn der Messung eine rapide Zunahme der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration gemessen (* Maximalwert 1), die danach langsam abfällt, bis sie am Ende ein Plateau erreicht. Im Anschluss wird zur Entladung des restlichen *Aequorins* CaCl_2 zugegeben, wodurch die Konzentration wieder sehr stark ansteigt (** Maximalwert 2).

Ein wesentliches Kriterium bei dieser Messung ist das Verhältnis des zweiten Maximalwerts (**), der durch Zugabe von CaCl_2 nach Beendigung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Messung zur Entladung des restlichen *Aequorins* erhalten wird, zum ersten Maximalwert (*), der durch den ZWE-induzierten Ca^{2+} -Einstrom erhalten wird. Dieses Verhältnis wurde für die *MATH2* und *MATH3* *k.o.*-Mutante und den jeweils parallel gemessenen WT berechnet (Tab. 3.2). Die Werte der Verhältnisse beider Maximalwerte unterscheiden sich in den Mutanten nicht deutlich vom jeweils parallel gemessenen WT. Daraus geht hervor, dass sowohl MATH2 als

auch MATH3 keine Rolle für den cytosolischen Ca^{2+} -Einstrom durch den ZWE von *P. indica* spielen.

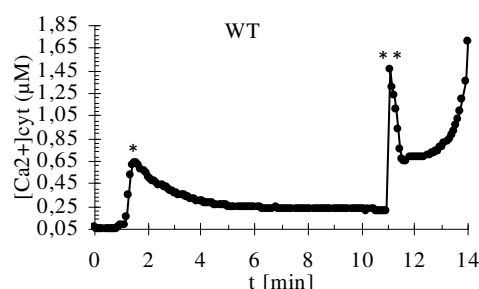


Abb. 3.21: Messung des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Gehalts in Wurzeln von *Apoaequorin*-transformierten WT-Keimlingen von *Arabidopsis* nach Applikation von 100 μl ZWE.

*durch ZWE induzierter Maximalwert 1 des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Einstroms

** Maximalwert 2 durch Entladung des restlichen *Aequorins* nach Beendigung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Messung mit CaCl_2

Tab.3.2: Verhältnis von Maximalwert 2 zu Maximalwert 1 bei der Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in *Arabidopsis*-Wurzeln nach Zugabe des ZWE.

* durch ZWE-induzierter Ca^{2+} -Einstrom

** durch Entladung des *Aequorins* nach Beendigung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Messung mit CaCl_2

n = 2-6

Linie	Maximalwert 1*	Maximalwert 2**	Maximalwert 2 : Maximalwert 1
<i>MATH2 k.o.</i>	$0,0997 \pm 0,0530$	$0,1833 \pm 0,0795$	$1,8941 \pm 0,2092$
WT	$0,6399 \pm 0,1178$	$1,4682 \pm 0,2667$	$2,2878 \pm 0,0215$
<i>MATH3 k.o.</i>	$0,2026 \pm 0,0375$	$1,3519 \pm 0,0855$	$6,8364 \pm 1,1554$
WT	$0,2251 \pm 0,0282$	$1,2739 \pm 0,1197$	$5,7846 \pm 1,2736$

3.4 Subzelluläre Lokalisation von MATH1 und MATH2

3.4.1 Herstellung von Antikörpern gegen MATH1 und -2

Es wurden Antikörper gegen synthetische Peptide aus MATH1 und -2 in Kaninchen von Agrisera (Schweden) hergestellt. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

MATH1 (aa 194-206) (NH₂-) CPIDTFKDPTKGYL (-CONH₂)

MATH2 (aa 275-287) (NH₂) CPQELLKAKPYDKV (-CONH₂).

Die Peptidsequenzen befanden sich jeweils in einer der beiden MATH-Domänen. Pro Antikörperherstellung wurden zwei Kaninchen immunisiert und die Seren vor den Immunisierungen und nach der dritten und vierten Immunisierung in einem Western blot getestet (Abb. 3.22). Beide Proteine sind etwa 40 kDa gross.

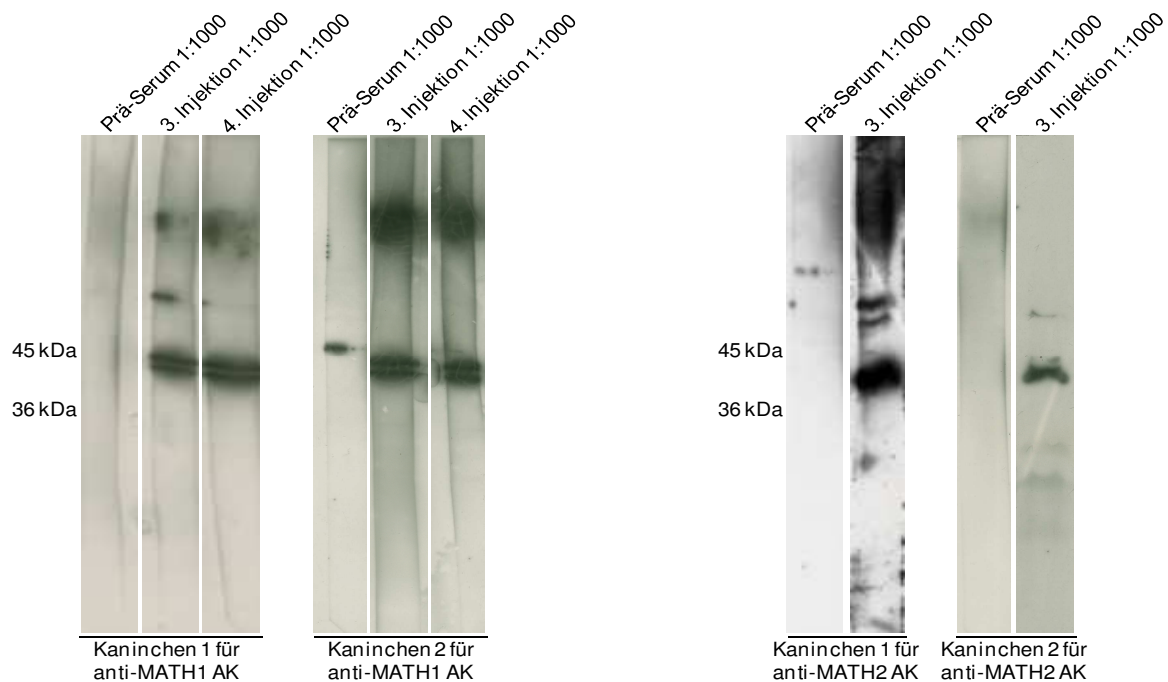


Abb. 3.22: Immunologische Charakterisierung von Seren gegen MATH1 und MATH2. Die Seren nach der 3. und 4. Injektion (MATH1) bzw. nach der 3. Injektion (MATH2) wurden getestet und mit dem Prä-Immunserum verglichen.

Die Antiseren gegen MATH1 gaben das beste Signal nach der vierten Injektion und der Unterschied zwischen den Seren beider Kaninchen war sehr gering. Sie gaben ein gutes Signal bis zu einer Verdünnung von 1:3000 (nicht gezeigt). Die Seren detektierten eine Doppelbande, was nahe legt, dass MATH1 in zwei verschiedenen Varianten vorkommt. Peškan-Berghöfer *et al.* (2004) zeigte ebenfalls zwei verschiedene Grössenvarianten dieses Proteins mittels 2D-Gelelektrophorese und anschliessender Massenspektrometrie.

Die Antiseren gegen MATH2 gaben bereits das beste Signal nach der dritten Injektion, wobei die Antikörperkonzentration in Kaninchen 1 deutlich höher war als in Kaninchen 2. Der Antikörper aus Kaninchen 1 gab ein gutes Signal bis zu einer Verdünnung von 1:8000, der aus Kaninchen 2 nur bis zu einer Verdünnung von 1:1000 (nicht gezeigt).

3.4.1.1 *Peptide Competition Assay*

Nach der Antikörperherstellung gegen MATH1 und -2 wurde die Spezifität dieser Antikörper mit Hilfe des *Peptide competition assays* nachgewiesen. Dazu wurden die Antikörper mit einem Überschuss der synthetischen Peptide, gegen die sie generiert wurden, vorinkubiert, bevor sie in einem Western blot verwendet wurden. Sind die Antikörper spezifisch, sollten die zugegebenen Peptide die Bindungsstellen der Antikörper besetzen und damit verhindern, dass die Antikörper noch an die Membran (an ihr entsprechendes Antigen) binden können.

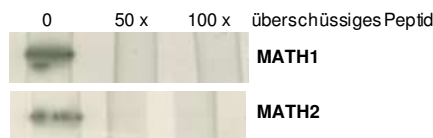


Abb. 3.23: Peptide competition assay. Der Assay wurde mit 0, 50-fachem und 100-fachem Peptidüberschuss durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Fig. 3.23 aufgezeigt. Ein Signal für beide Proteine wurde nur in den Kontrollen erhalten, in denen kein Peptid an die Antikörper gebunden wurde. Demnach sind die Antikörper gegen MATH1 und MATH2 spezifisch. Die Spezifität des Antikörpers gegen MATH2 wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass er kein Signal mehr in der MATH2 *k.o.*-Linie gibt (Abb. 3.3).

3.4.2 Zellfraktionierung

Wurzel- und Sprossgewebe wurden im Extraktionspuffer homogenisiert und daraus ein 12000 g Pellet, ein 100000 g Pellet und ein 100000 g Überstand hergestellt. In der 12000 g Fraktion sollten sich dabei vor allem Zelltrümmer, Kerne und die Organellen befinden, im 100000 g Pellet vorrangig Mikrosomen und im 100000 g Überstand vor allem das Cytosol. In einem darauffolgenden Western blot wurden die beiden Proteine MATH1 und MATH2 in diesen Fraktionen nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.24 gezeigt. MATH1 wurde sowohl in Wurzeln als auch in den Sprossen detektiert. In den Wurzeln wurde das stärkste Signal in der 100000 g Fraktion, ein mittelstarkes Signal in der 12000 g Fraktion und das schwächste Signal im 100000 g Überstand nachgewiesen. In den Sprossen konnte MATH1 dagegen nur in den 100000 g und 12000 g Fraktionen nachgewiesen werden. Insgesamt waren die Signale von MATH1 in den Wurzeln stärker als in den Sprossen. MATH2 wurde sowohl in den Sprossen als auch in den Wurzeln jeweils nur in den 100000 g Pellets nachgewiesen. Die Stärke des Signals von MATH2 war dabei in beiden Geweben gleich.

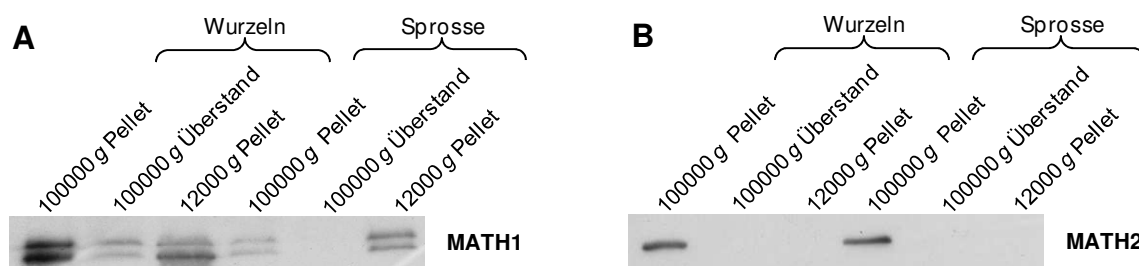


Abb. 3.24: Western blot zum Nachweis von MATH1 und MATH2 in verschiedenen Zellfraktionen aus Wurzel- und Sprossgewebe..

Zur weiteren subzellulären Lokalisation wurden aus den 100000 g Pellets die Plasmamembranen (PM) mittels 2-Phasen-Trennung isoliert. Bei dieser Methode werden verschiedene Zellmembranen voneinander getrennt. Dies geschieht mit Hilfe von zwei Polymeren, Polyethylenglycol (PEG) und Dextran (Dx), zu denen die verschiedenen Membranen der Zelle jeweils unterschiedliche Affinitäten besitzen. Plasmamembranen haben dabei die höchste Affinität gegenüber PEG und nahezu keine Affinität gegenüber Dx. Die inneren Zellmembranen sind dagegen mehr affin gegenüber Dx und darüberhinaus abhängig von der Polymer- und Salzkonzentration.

100000 g Pellets mehrerer Fraktionierungen wurden vereint und die Plasmamembranen daraus isoliert. Mit dem Wurzelgewebe war die 2-Phasen-Trennung erfolgreich, mit dem Sprossgewebe nicht, da sich die Phasen nicht eindeutig trennen liessen.

Im darauffolgenden Western blot wurden die beiden Proteine MATH1 und MATH2 in der neu erhaltenen Fraktion zusammen mit den anderen Fraktionen wieder nachgewiesen (Abb. 3.25). Bei der PEG-Phase sollte beachtet werden, dass die Isolation von Plasmamembranen sehr aufwendig, die Ausbeute dabei sehr gering (1 : 1000000) und die Reinheit dieser Fraktion gegenüber den anderen Fraktionen sehr viel höher ist. Aus diesem Grund wurde eine geringere Menge Protein im Vergleich zu den anderen Fraktionen aufgetragen. Aus den unterschiedlichen Signalintensitäten zwischen der PEG-Phase und den anderen Fraktionen kann folglich nicht auf die relative Abundanz beider Proteine in Bezug auf diese Fraktion geschlossen werden. Es zeigte sich, dass MATH1 diesmal nahezu nur im Wurzelgewebe nachgewiesen werden konnte. Die stärksten Signalintensitäten wurden dabei im 12000 g Pellet und im 100000 g Pellet der Wurzeln erhalten. Im 100000 g Überstand erschien nur ein verhältnismässig schwaches Signal. MATH1 wurde auch in der PEG-Phase der Wurzeln nachgewiesen. MATH2 wurde gleichermassen im Spross- und im Wurzelgewebe nachgewiesen. Im Sprossgewebe wurde MATH2 im 100000 g Pellet und etwas schwächer im 12000 g Pellet nachgewiesen. Es lässt sich jedoch nicht ausschliessen, ob MATH2 auch in der PEG-Phase des Sprossgewebes nachweisbar wäre, wenn die 2-Phasen-Trennung erfolgreich gewesen wäre. In den Wurzeln wurde MATH2 im 100000 g Pellet, etwas schwächer im 12000 g Pellet, sehr wenig im 100000 g Überstand und in der PEG-Phase detektiert.

Zusätzlich wurden das 12000 g Pellet als Organellenfraktion und der 100000 g Überstand als cytosolische Fraktion mit Markerantikörpern bestätigt. Für die Organellenfraktion wurde der anti-VDAC1 (voltage-dependent anion-selective channel protein 1) Antikörper [anti-(rabbit IgG), Agrisera, Schweden] verwendet, dessen Antigen (VDAC1) in der äusseren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Der anti-UGPase (UDP-glucose pyrophosphorylase)

Antikörper [anti-(rabbit IgG), Agrisera, Schweden] wurde als Markerantikörper für die cytosolische Fraktion verwendet. UGPase fungiert als ein Schlüsselenzym in der Synthese von Saccharose. VDAC1 wurde nur in den 12000 g Pellets von Spross- und Wurzelgewebe nachgewiesen und bestätigte damit diese Fraktionen als Organellen-Fraktionen. Die Signale waren jeweils nur sehr schwach und weisen auf eine niedrige Abundanz dieses Proteins hin. UGPase wurde im Sprossgewebe in allen Fraktionen nachgewiesen. In den Wurzeln wurde UGPase am stärksten im 100000 g Überstand und deutlich schwächer oder gar nicht in den anderen Fraktionen detektiert. Dass der 100000 g Überstand die cytosolische Fraktion repräsentiert konnte somit nur für das Wurzelgewebe bestätigt werden.

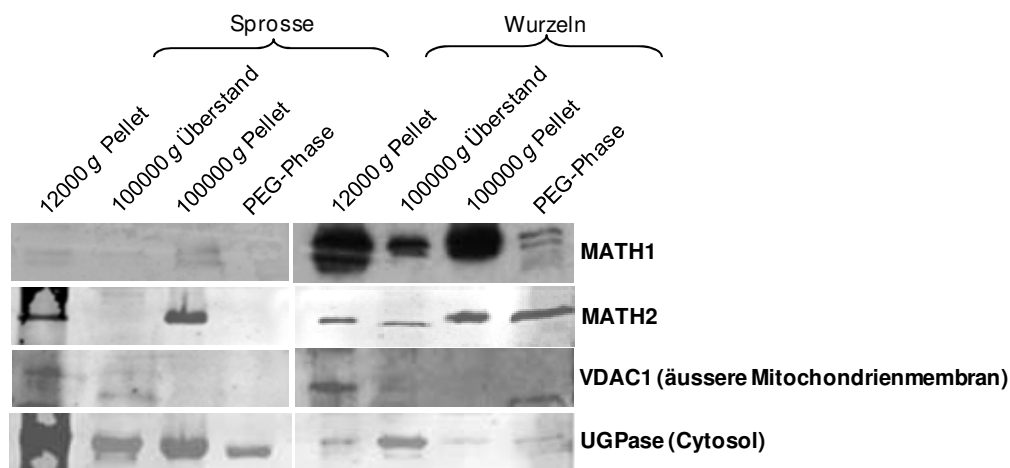


Abb. 3.25: Western blot zum Nachweis von MATH1, MATH2 und zwei Markern, VDAC1 und UGPase, in verschiedenen Zellfraktionen. VDAC1 (*voltage-dependent anion-selective channel protein 1*) wurde dabei als Marker für die Organellen-Fraktion (12000 g Pellet), UGPase (*UDP-Glucosepyrophosphorylase*) als cytosolischer Marker (100000 g Überstand) verwendet.

Zum Nachweis des 100000 g Pellets als Membranfraktion war kein Markerantikörper verfügbar. Das 100000 g Pellet wurde deshalb mittels Massenspektrometrie analysiert. Es wurden 15 Membranproteine, 3 Mitochondrienproteine, ein Chloroplastenprotein, zwei cytosolische Proteine und ein Vakuolenprotein identifiziert (Tab. 3.3). Von den 15 Membranproteinen sind 12 davon ribosomale Proteine. Ribosomen können entweder löslich oder gebunden an das Endoplasmatische Reticulum (ER) vorkommen. Da es jedoch sehr unwahrscheinlich ist, dass lösliche Ribosomen während der Ultrazentrifugation pelletieren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den gefundenen ribosomalen Proteinen um ER-gebundene handelt. Das 100000 g Pellet besteht demnach vorwiegend (zu 68 %) aus Membranproteinen und kann folglich als Membranfraktion klassifiziert werden.

Tabelle 3.3: Durch Massenspektrometrie identifizierte Proteine des 100000 g Pellets nach Zellfraktionierung durch Differentialzentrifugation.

Membranproteine	40S ribosomales Protein S20 S22
	60S ribosomales Protein L27
	60S acidisches ribosomales Protein P0 B
	60S ribosomales Protein L18
	60S ribosomales Protein L15
	60S ribosomales Protein L7
	60S ribosomales Protein L7A
	40S ribosomales Protein S3A
	60S ribosomales Protein L5
	60S ribosomales Protein L4 A L1
	60S ribosomales Protein L3
	60S ribosomales Protein L4 B L1
	Ribonucleosid-Diphosphatreduktase, lange Kette
	AtBP2 (Luminales Bindeprotein 2, Vorstufe von BiP2)
	Adenosylhomocysteinase EC 3 3 1 1 S adenosyl L
cytosolische Proteine	Proteasome-Untereinheit beta Type1 EC 3 4 25 1 20S
	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, cytosolisch
Organellenproteine	Vorläufer der beta-Untereinheit der Mitochondrien-ATP-synthase
	beta-Untereinheit der Mitochondrien-ATP-synthase EC 3 6 3
	Vorläufer der beta-Untereinheit der Mitochondrien-ATP-synthase
	beta-Untereinheit der Chloroplasten-ATP-synthase EC 3 6 3 14
andere Proteine	Vacuolen-ATP-synthase, Untereinheit B, Isoform 2 EC 3 6

Zum Nachweis der PEG-Phase als PM-Fraktion war folglich auch kein Markerantikörper verfügbar. Für eine Analyse mittels Massenspektrometrie war insgesamt zu wenig Protein vorhanden. Da sich jedoch gezeigt hat, dass beide MATH-Proteine in den Membranfraktionen vorkommen (MATH1 darüberhinaus auch in der Organellenfraktion) und zumindest in den Wurzeln beide Proteine in der PEG-Phase nachweisbar waren, die vermutlich der PM-Fraktion entspricht, wurde die weitere Analyse zur Lokalisation von MATH1 und MATH2 mit Gefrierbruchmarkierung (Kapitel 3.4.3) und der Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.4.4) durchgeführt.

3.4.3 Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie

Weitere Untersuchungen zur Lokalisation von MATH1 und MATH2 wurden mit SDS-verdauter Gefrierbruchmarkierung und anschließender Elektronenmikroskopie durchgeführt (nach Fujimoto, 1995). Diese Methode ermöglicht eine direkte Lokalisation von Proteinen auf Membranen (Abb. 3.26). Aufgrund der Krümmung von Membranen, wenn sie Kompartimente in einer wässrigen Umgebung einschliessen, besitzen die resultierenden Membranhälften nach dem Gefrierbruch entgegengesetzte Krümmungen. Plasmamembranhälften, die zuvor gegen den extrazellulären Raum gerichtet waren, werden als *exoplasmic fracture faces* (EF) bezeichnet. Plasmamembranhälften, die zuvor zum Cytoplasma hin gerichtet waren, werden als *protoplasmic fracture faces* (PF) bezeichnet (Abb. 3.27).

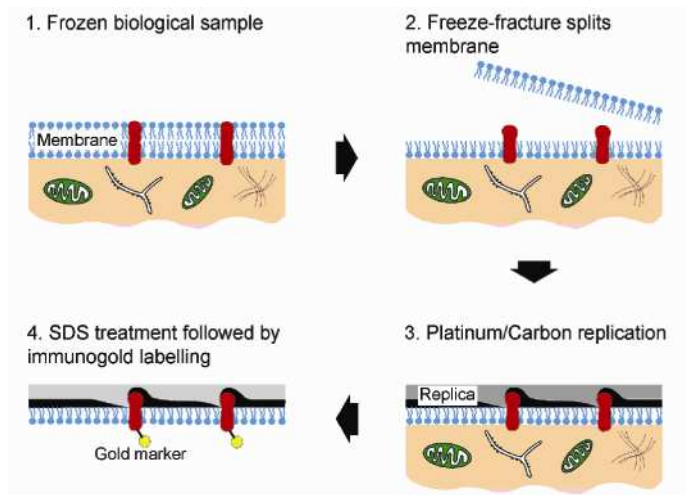


Abb. 3.26: Die Schlüsselschritte der Gefrierbruchmarkierung. Gewebe oder Zellmaterial wird rapide eingefroren und aufgebrochen (1 und 2). Der Gefrierbruch spaltet die Lipiddoppelschichten (2), wodurch die Bruchansicht exponiert wird. Von den aufgebrochenen Exemplaren werden Platin/Kohlenstoff-Replikate gemacht (3). Die Replikate werden mit SDS behandelt, um Zellkomponenten, die nicht an die Replikate gebunden sind, zu entfernen (4). Proteine, die anschliessend noch an die Replikate gebunden sind, werden Immunogold-markiert. Bei der Untersuchung unter dem Elektronenmikroskop sind die Elektronen-dichten Goldpartikel klar auf den Replikaten sichtbar, wodurch das Zielmolekül in der Membranebene markiert ist. (Robenek and Severs, 2008)

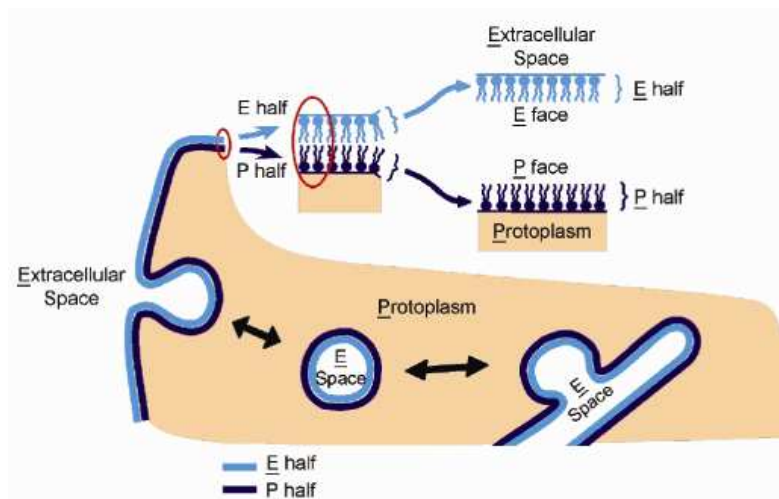


Abb. 3.27: Nomenklatur zur Beschreibung der Membranaspekte durch Gefrierbruch. Bei der Plasmamembran wird die an den extrazellulären Raum angrenzende Membranhälfte als E-hälfte bezeichnet und die an das Protoplasma angrenzende Membranhälfte als P-Hälfte bezeichnet. Der Begriff der Bruchansicht bezieht sich auf die Innenansicht der Membranen, die nach dem Gefrierbruch exponiert sind. Dagegen bezieht sich der Begriff Oberfläche auf die

wirkliche, natürliche Oberfläche der Membranen. Die Bruchansicht der P-hälfte wird als P-Ansicht (P face, PF) bezeichnet, während die der E-Hälfte als E-Ansicht (E face, EF) bezeichnet wird. Die tatsächlichen Membranoberflächen werden demzufolge P-Oberfläche (P surface, PS) bzw. E-Oberfläche (E surface, ES) bezeichnet. Diese Terminologie wird in ähnlicher Weise für die inneren Membranen angewendet. Wenn Membranvesikel durch die Plasmamembran durch Endocytose verursacht wurden, bildet die P-Hälfte die äussere Schicht der Vesikelmembran und die E-Hälfte die innere Schicht. Das Innere der Vesikel stammt vom extrazellulären Raum ab. Convexe Brüche zeigen demnach die E-Ansicht und konkave Brüche die P-Ansicht der Vesikelmembranen. In gleicher Weise kennzeichnet der Begriff "E" das Innere aller Ein-Membran-Organellen und den Raum zwischen den inneren und äusseren Membranen aller Doppelmembran-gebundenen Organellen (Kern, Mitochondrien und Chloroplasten). Der Begriff "P" umfasst das Cytoplasma, das Nucleoplasma, die Mitochondriematrix und das Stroma der Chloroplasten. (Robenek and Severs, 2008)

Diese Methode wurde mit Spross- und Blattprotoplasten und angereicherten Plasmamembranen aus dem Sprossgewebe von *Arabidopsis* durchgeführt. Im Falle der Gefrier-gebrochenen Plasmamembrananreicherungen aus den Sprossen sollte beachtet werden, dass von der Art der Krümmung der jeweiligen Membranansicht nicht auf die ursprüngliche Orientierung der Membran (EF oder PF) sowie auch nicht auf die Herkunft der Membran an sich geschlossen werden kann.

Das Ergebnis der Gefrierbruchmarkierung mit Plasmamembrananreicherungen von *Arabidopsis*-Sprossen ist in Abb. 3.28 gezeigt. Antikörpersignale wurden sowohl direkt an den Vesikeln (Pfeilköpfe) als auch in grösseren Proteinaggregaten (Pfeile), die abgesondert von den Membranvesikeln waren, erhalten. Der grössere Anteil der Signale (etwa 70 %) kam dabei an den löslichen Proteinaggregaten vor, der kleinere Anteil der Signale (etwa 30 %) war Membran-gebunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass MATH1 und MATH2 periphere Membranproteine sind, die sich leicht von der Membran ablösen lassen.

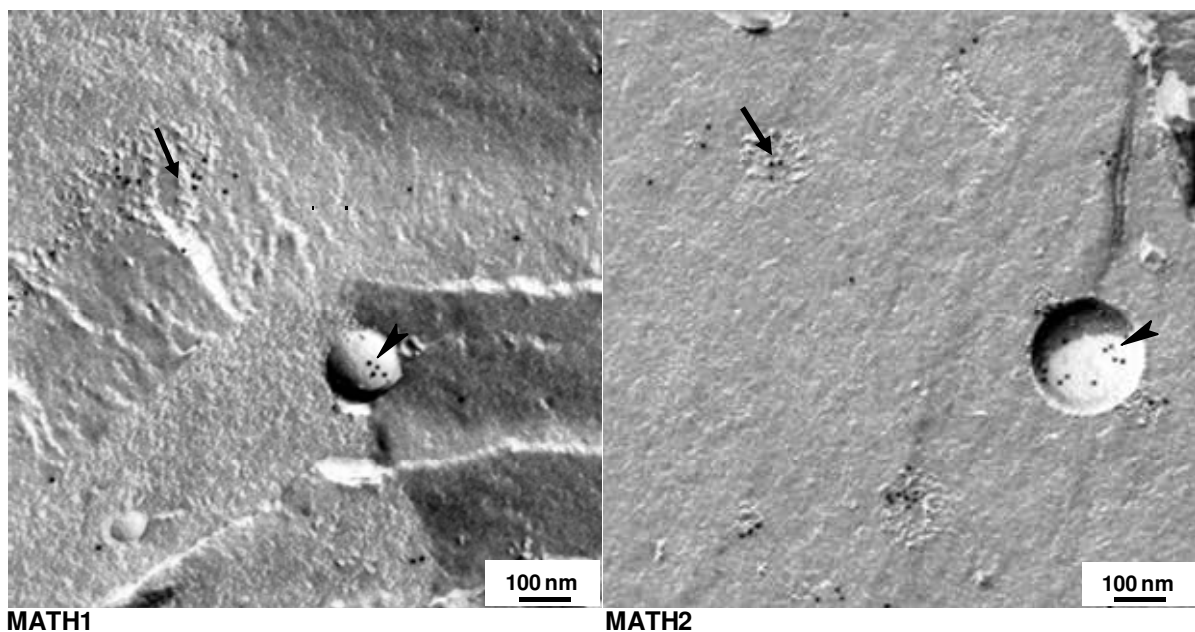


Abb. 3.28: SDS-behandelte Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie mit Plasmamembrananreicherungen von *Arabidopsis*-Sprossen. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen MATH1 und MATH2 markiert. Sowohl MATH1 als auch MATH2 konnten in diesen Proben nachgewiesen werden, wobei der grössere Anteil der Signale an Vesikeln gefunden wurde, die vermutlich aus grösseren und löslichen Proteinclustern bestehen (Pfeile). Der kleinere Anteil der Signale war direkt mit den Membranvesikeln assoziiert (Pfeilspitzen). In Zusammenarbeit mit PD Dr. Westermann, FSU Jena.

Die Analyse der Blatt- (Abb. 3.29) als auch der Wurzelprotoplasten (Abb. 3.30) ergab, dass beide MATH-Proteine Plasmamembran-assoziiert sind und dabei in den extrazellulären Raum gerichtet sind. In Abb. 3.29 und 3.30 ist gezeigt, dass Signale für beide MATH-Proteine explizit nur auf der EF-Seite der Plasmamembranen (PM) lokalisiert sind (Pfeilköpfe). Auf den PF-Seiten der Plasmamembranen konnten dagegen keine Signale gefunden werden.

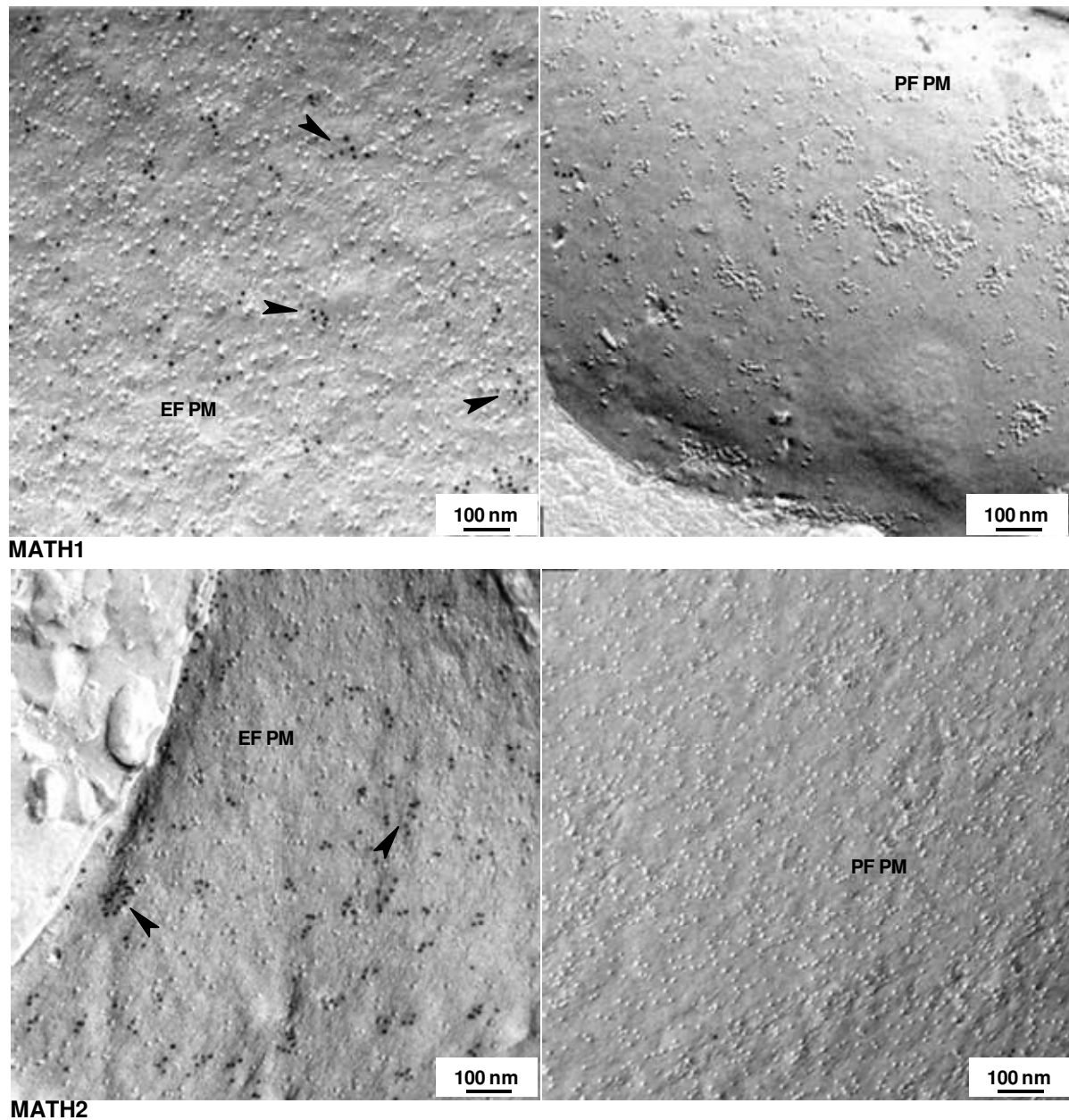


Abb. 3.29: SDS-behandelte Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie mit *Arabidopsis*-Blattprotoplasten. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen MATH1 und MATH2 markiert. Beide Proteine wurden an der EF-Seite der Plasmamembran lokalisiert (Pfeilpitzen). Auf der PF-Seite gab es dagegen keine Signale. PM – Plasmamembran; EF – *exoplasmic fracture face*; PF – *protoplasmic fracture face*. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Westermann, FSU Jena.

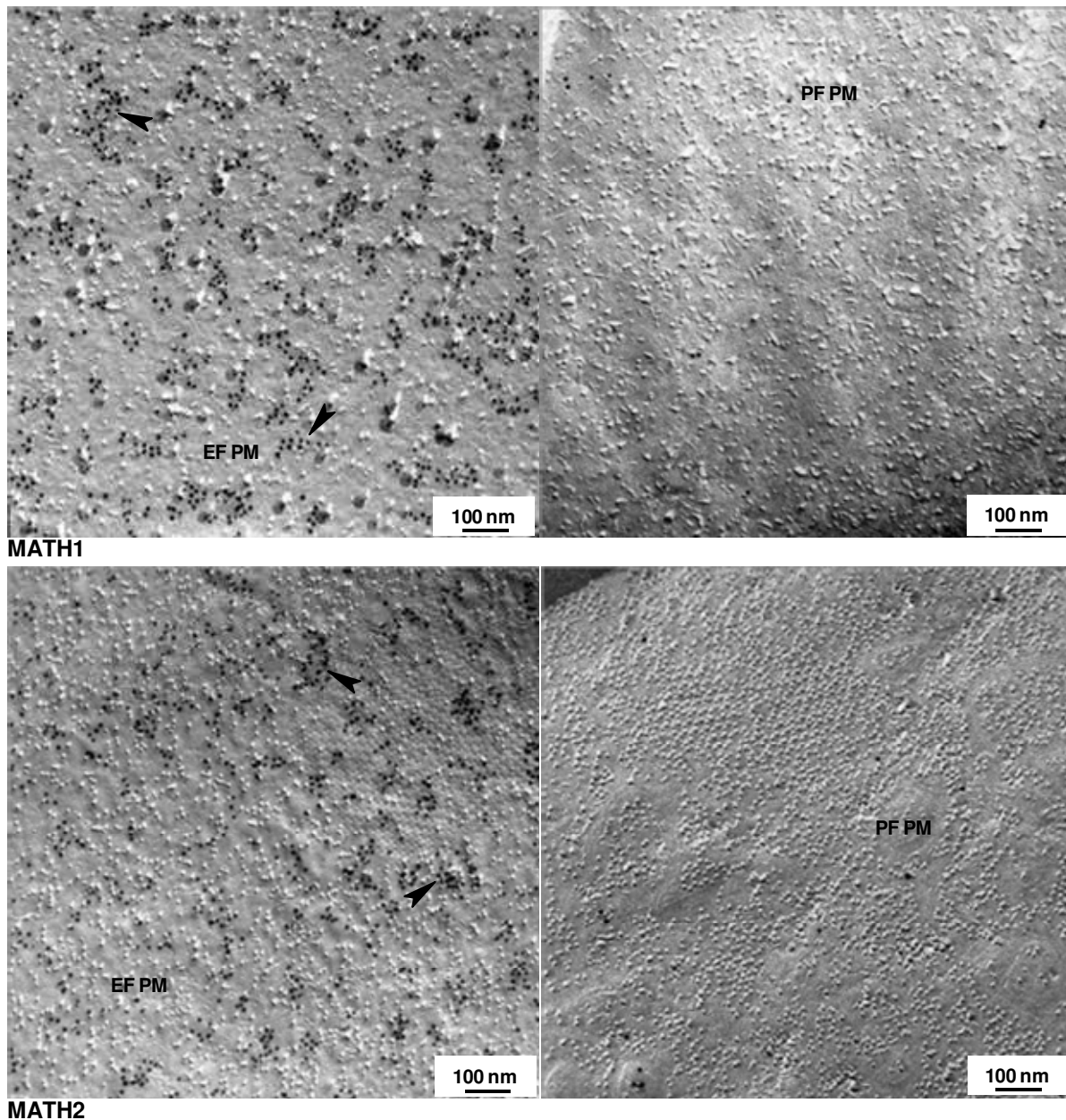


Abb. 3.30: SDS-behandelte Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie mit *Arabidopsis*-Wurzelprotoplasten. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen MATH1 und MATH2 markiert. Beide Proteine wurden an der EF-Seite der Plasmamembran lokalisiert (Pfeilpitzen). Auf der PF-Seite gab es dagegen keine Signale. PM – Plasmamembran; EF – *exoplasmic fracture face*; PF – *protoplasmic fracture face*. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Westermann, FSU Jena.

MATH1 kommt deutlich mehr in den Wurzeln als in den Blättern vor. MATH2 ist dagegen insgesamt weniger vorhanden als MATH1 und darüberhinaus in Wurzel- und Blattgewebe gleichermaßen nachweisbar (Abb. 3.31).

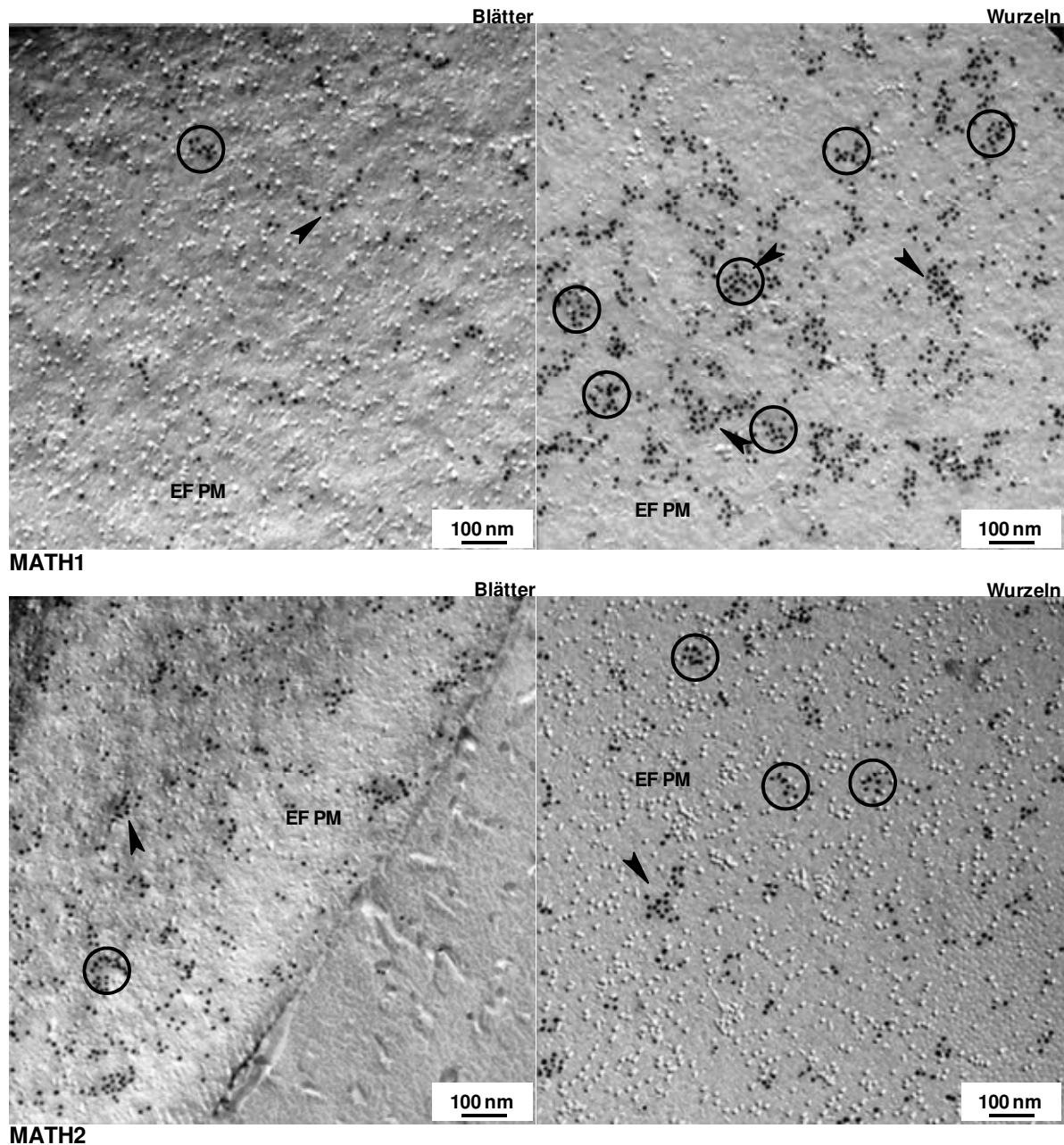


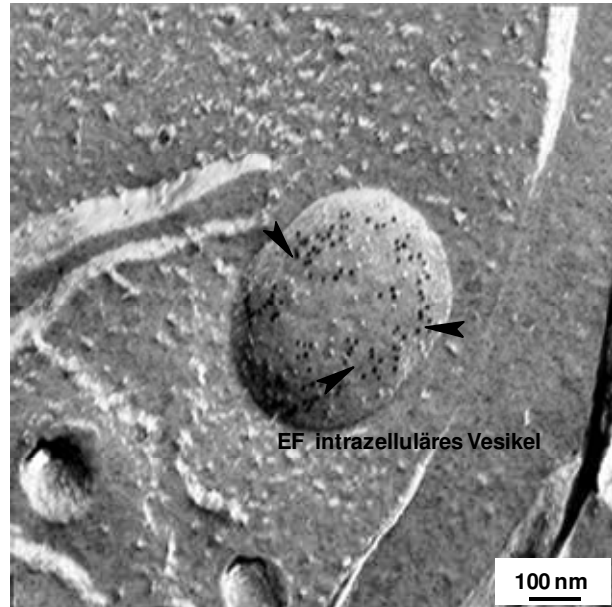
Abb. 3.31: SDS-behandelte Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie im Vergleich zwischen Blatt- und Wurzelprotoplasten von *Arabidopsis*. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen MATH1 und MATH2 markiert. Für MATH1 wurden beträchtlich mehr Signale in den Wurzelprotoplasten als in den Blattprotoplasten detektiert (Pfeilspitzen). Für MATH2 konnten dagegen keine Unterschiede in der Häufigkeit der Signale zwischen Blatt- und Wurzelprotoplasten festgestellt werden (Pfeilspitzen). Beide Proteine sind in *Clustern* einer Grösse von etwa 100 nm angeordnet (Kreise). PM – Plasmamembran; EF – *exoplasmic fracture face*. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Westermann, FSU Jena.

Beim Betrachten der zweidimensionalen Verteilung beider MATH-Proteine auf der EF-Seite der Plasmamembran fällt auf, dass sie in Strukturen von einer Grösse von etwa 100 nm angeordnet sind (Abb. 3.32, Kreise). Diese Grösse entspricht der von *lipid rafts*, was nahelegt, dass MATH1 und MATH2 in *lipid rafts* vorkommen könnten.

Darüberhinaus konnte MATH1 im Lumen eines intrazellulären Vesikels (EF) detektiert werden. Es könnte sich dabei um ein Vesikel des sekretorischen Stoffwechselweges handeln

(Abb. 3.32, Pfeilspitzen). Es kann davon ausgegangen werden, dass MATH2 ebenso in diesen Vesikeln akkumuliert. Keine Signale konnten dagegen an den Membranen intrazellulärer Organellen nachgewiesen werden (Abb. 3.33).

Abb. 3.32: SDS-behandelte Gefrierbruch-markierung-Elektronenmikroskopie mit *Arabidopsis*-Wurzelprotoplasten. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen MATH1 markiert. MATH1 konnte dabei im Lumen eines Vesikels (EF) lokalisiert werden (Pfeilspitzen), das vermutlich zum sekretorischen Stoffwechselweg gehört. EF – *exoplasmic fracture face*. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Westermann, FSU Jena.



MATH1

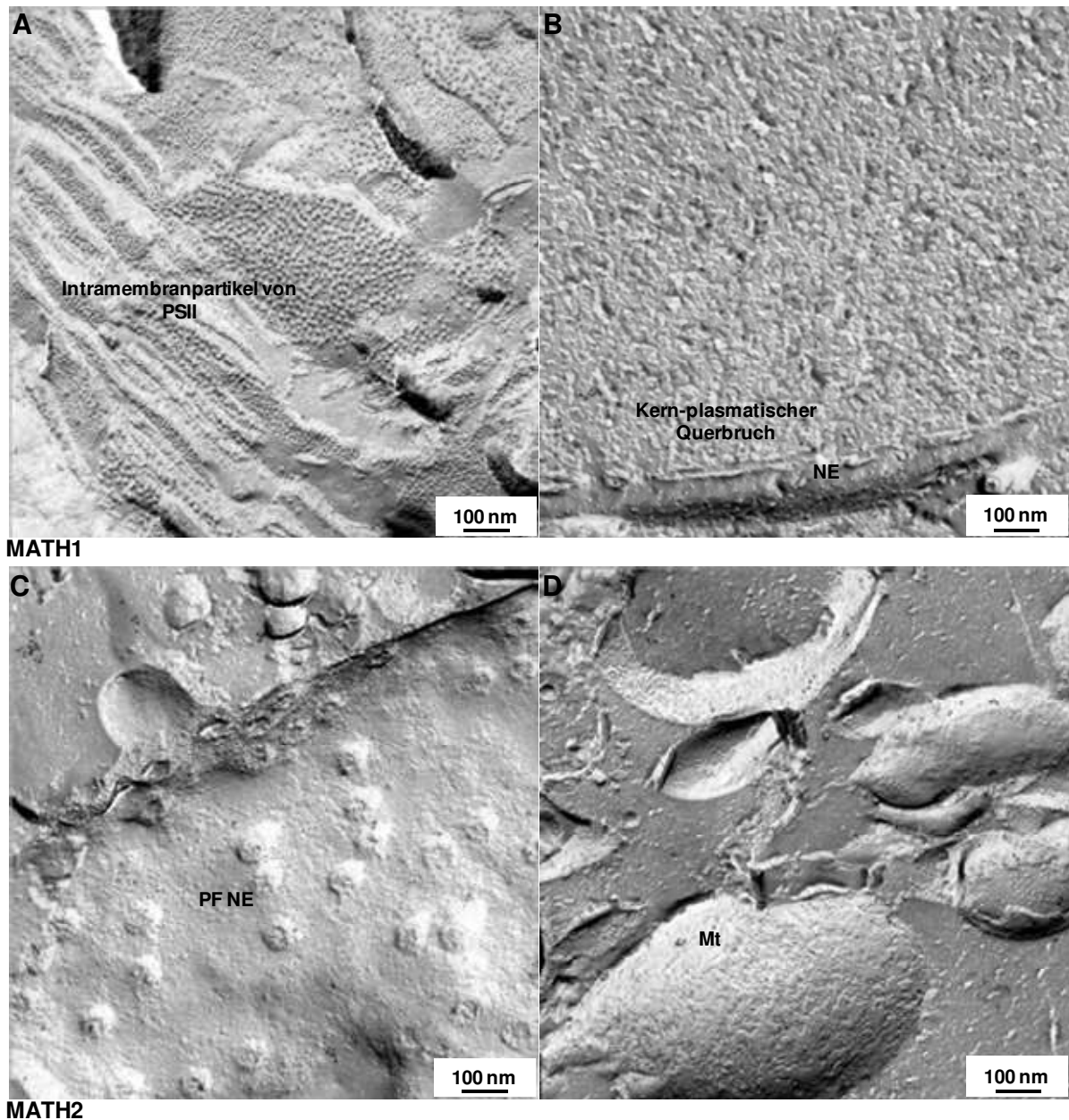


Abb. 3.33: SDS-behandelte Gefrierbruchmarkierung-Elektronenmikroskopie mit Protoplasten aus *Arabidopsis*. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen MATH1 und MATH2 markiert. Weder MATH1 noch MATH2 konnten an intrazellulären Organellen nachgewiesen werden. (A) Intramembranpartikel von PSII von Sprossprotoplasten, (B) und (C) Nucleus, (D) Mitochondrium. EF - *exoplasmic fracture face*; PF - *protoplasmic fracture face*; PSII - Photosystem II; NE - *nuclear envelope* (Kernpore); Mt – Mitochondrium. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Westermann, FSU Jena.

3.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Da vorangegangene Analysen zur Lokalisation von MATH1 und MATH2 gezeigt haben, dass sich beide Proteine an der Außenseite der Plasmamembran befinden (Kapitel 3.4.2 und 3.4.3), wurde die Untersuchung der Lokalisation mit Fluoreszenzmikroskopie komplettiert. Diese Methode erlaubt die Visualisierung markierter Proteine an der Außenseite intakter Zellen. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen an *Arabidopsis*-Wurzeln und isolierten Protoplasten aus dem Spross- und Wurzelgewebe von *Arabidopsis*.

Die Ergebnisse der Protoplastenanalyse sind in Abb. 3.34 und 3.35 gezeigt. Wieder konnten beide MATH-Proteine an der Außenseite der Plasmamembran nachgewiesen werden. MATH1 ist deutlich mehr in den Wurzeln als in den Blättern exprimiert. MATH2 ist gleich häufig in Wurzel- und Blattgewebe nachweisbar. Beide Proteine sind in *Clustern* angeordnet und nicht homogen über die Membranoberfläche verteilt. Diese Anordnung könnte darauf hinweisen, dass beide MATH-Proteine mit *lipid rafts* assoziiert sind.

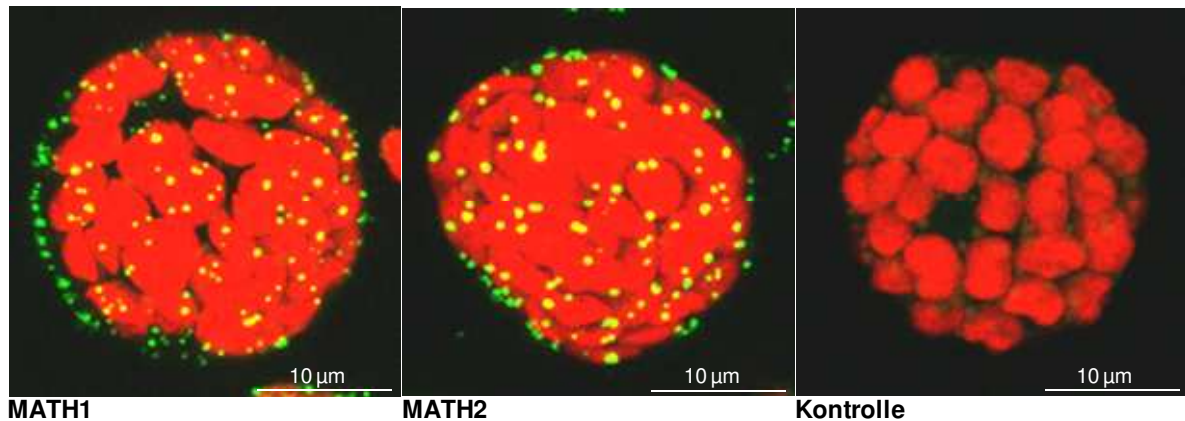


Abb. 3.34: Fluoreszenzmikroskopie mit Blattprotoplasten von *Arabidopsis*. Die Protoplasten wurden mit Antikörpern gegen MATH1, MATH2 oder nur mit dem sekundären Antikörper (Kontrolle) markiert (grüne Signale). Die Chloroplasten emittieren eine Autofluoreszenz im Bereich von 600 – 765 nm (rot). In Zusammenarbeit mit Dr. Eitner, FSU Jena.

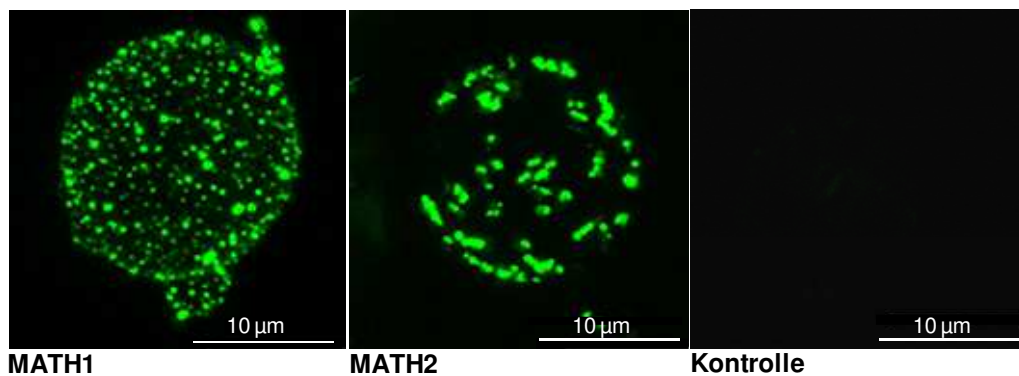


Abb. 3.35: Fluoreszenzmikroskopie mit Wurzelprotoplasten von *Arabidopsis*. Die Protoplasten wurden mit Antikörpern gegen MATH1, MATH2 oder nur mit dem sekundären Antikörper (Kontrolle) markiert (grüne Signale). In Zusammenarbeit mit Dr. Eitner, FSU Jena.

Zum Schluss wurde die Lokalisation von MATH1 und MATH2 an der Außenseite der Plasmamembran an *Arabidopsis*-Wurzeln nachgewiesen (Abb. 3.36).

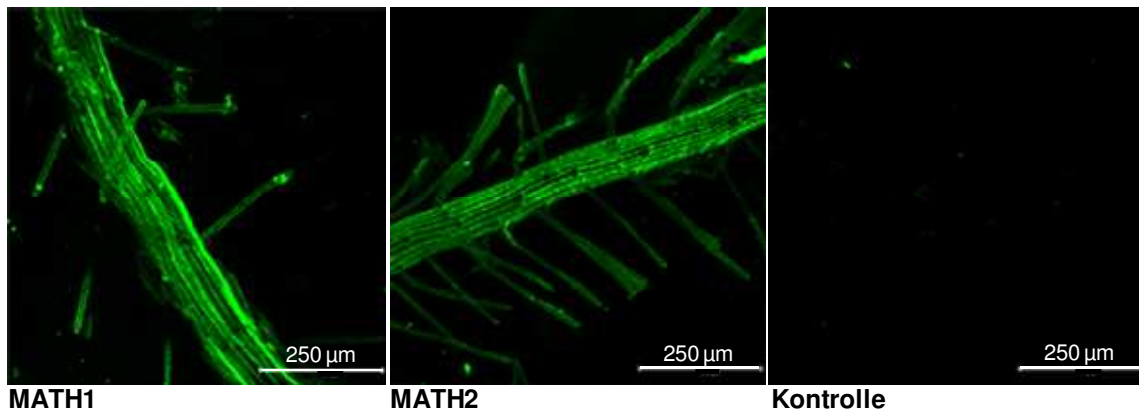


Abb. 3.36: Fluoreszenzmikroskopie mit *Arabidopsis*-Wurzeln. Die Wurzeln wurden mit Antikörpern gegen MATH1, MATH2 oder nur mit dem sekundären Antikörper (Kontrolle) markiert. Die Antikörpermarkierungen sind dabei als grüne Signale sichtbar. In Zusammenarbeit mit Dr. Eitner, FSU Jena.

3.5 Endoglykosidaseverdau

Die meisten extrazellulären Proteine sind hoch glykosyliert. Für MATH1 und MATH2 sollte untersucht werden, ob sie ebenfalls glykosyliert sind, da nachgewiesen wurde, dass beide Proteine an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. Es gibt zwei verschiedene Arten der Glykosylierung, N-Glykosylierung und O-Glykosylierung. Sowohl N- als auch O-Glykosylierung von Proteinen kann untersucht werden, indem Proteine mit Endoglykosidasen behandelt und anschließend in einem Western blot detektiert werden (Glykosylierte Proteine ergeben nach dem Verdau mit Endoglykosidasen mehr Banden als nicht-verdaute, die zudem weniger kDa aufweisen). Endo H_f wurde dabei als N-Glykosidase und Endo- α -N-acetylgalactosamidase wurde dabei als O-Glykosidase verwendet.

Das Ergebnis ist in Abb. 3.37 dargestellt. Weder MATH1 noch MATH2 zeigten unterschiedliche Signale im Vergleich zu den Kontrollen, wenn sie mit den Endoglykosidasen behandelt wurden. Beide Proteine sind folglich nicht glykosyliert.

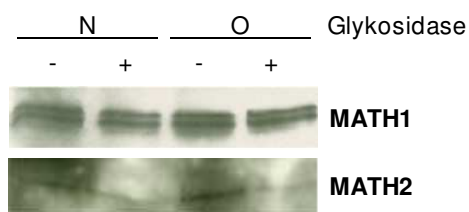


Fig. 3.37: Western blot zum Nachweis von MATH1 und MATH2 nach Endoglykosidase-Verdau. Für den Verdau von N-glykosylierten Proteinen wurde Endo H_f (N) und für den Verdau von O-glykosylierten Proteinen wurde Endo- α -N-acetylgalactosamidase (O) verwendet.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die mutualistische Interaktion von *Arabidopsis* mit dem endophytischen Pilz *P. indica* untersucht. *P. indica* kolonisiert die Wurzeln von *Arabidopsis*, fördert das Pflanzenwachstum und die Produktion von Samen und erhöht die Toleranz gegenüber abiotischem und biotischem Stress (Varma *et al.*, 1999; Varma *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2003; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005). Die Interaktion wurde dabei auf molekularer Ebene in Bezug auf die Signalwege in der Pflanze hinsichtlich der Proteine MATH1, MATH2, MATH3, PDK1.1, PDK1.2, MAPK3 und MAPK6 analysiert. Zunächst wurde untersucht, ob das Ausschalten der entsprechenden Gene einen Phänotyp unter Standardwachstumsbedingungen zeigt, bevor die Rolle der Proteine mittels dieser *k.o.*-Linien für die Interaktion mit *P. indica* untersucht wurde.

4.1 Phänotypische Charakterisierung der *k.o.*-Mutanten

4.1.1 Embryoletalität der *MATH1 k.o.* und der *MATH2 x MATH3 k.o.*-Mutante

Bei der Isolation einer *MATH1 k.o.*-Linie hat sich gezeigt, dass nur heterozygote *k.o.*-Pflanzen lebensfähig sind. Eine vollständige Inaktivierung dieses Gens scheint dagegen zu bewirken, dass die Pflanzen embryoletal sind. Samen, die nicht mehr in der Lage waren zu keimen (etwa 25 % aller ausgelegten Samen), wurden gebleicht und unter dem Mikroskop analysiert. In diesen Samen konnten entweder reife Embryos (mit einer Achse und zwei Kotyledonen), Strukturen, die aussahen, als würde sich der Embryo auflösen oder leere Samen gefunden werden (Abb. 3.1). In den noch unreifen Samen in den Schoten konnte dagegen kein auffälliger Mutantenphänotyp gefunden werden (Kapitel 3.1). Dies führte zu der Annahme, dass homozygote *MATH1 k.o.*-Mutanten noch in der Lage zu sein scheinen, während der Embryogenese reife Embryos anzulegen und anschliessend in die Dormanz zu gehen. Sie scheinen die Dormanz jedoch nicht mehr durchbrechen und die Keimung einleiten zu können. Stattdessen könnte es in dieser Phase, in der die Pflanzen keimen würden, zur Auflösung des Embryos z.B. durch hydrolytische Enzyme kommen.

Während der Keimung bricht der Embryo die Dormanz und geht in die vegetative Entwicklung über. Gespeicherte Reserven im Endosperm oder den Kotyledonen werden mobilisiert, um den Keimling zu bilden. Die Keimung wird durch eine Reihe exogener Faktoren wie Feuchtigkeit, Licht und Temperatur ausgelöst. Es könnte demnach sein, dass die homozygoten *MATH1 k.o.*-Samen bei der Perzeption der Signale, die die Keimung auslösen, beeinträchtigt sind oder dass sie das Signal in davon abgeleitete Signalwege nicht umwandeln

können. Es könnte auch sein, dass *MATH1* *k.o.*-Samen für diesen Prozess in der Zell-zu-Zell-Kommunikation beeinträchtigt sind.

Array-Daten haben gezeigt, dass *MATH1* das stärkste Expressionsniveau in quellenden Samen besitzt (*eFP browser*, *Probe set ID*: 257673_at). Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass *MATH1* eine Rolle bei der Keimung spielt. In der weiteren Entwicklung der Pflanze ist *MATH1* in den Wurzeln sehr hoch exprimiert. Im Sprossgewebe ist dieses Protein nur während der vegetativen Entwicklungsphase exprimiert. Die Transkriptmenge ist dabei geringer als im Wurzelgewebe und nimmt im Verlauf dieser Phase immer mehr ab. In der reproduktiven Entwicklungsphase wird *MATH1* im oberirdischen Teil der Pflanze gar nicht mehr exprimiert (*eFP browser*, *Probe set ID*: 257673_at). Auf Proteinebene ergaben die Analysen zur subzellulären Lokalisation von *MATH1* in dieser Arbeit ebenfalls, dass dieses Protein im Wurzelgewebe sehr hoch abundant ist und im Vergleich dazu im Sprossgewebe deutlich weniger vorkommt oder nicht mehr nachzuweisen ist. Das Material stammte dabei aus wenigen Wochen alten Keimlingen. (Kapitel 3.4.2 – 3.4.4). Demnach scheint *MATH1* essentiell für die Keimung zu sein und darüberhinaus während der Pflanzenentwicklung eine wichtige Funktion in den Wurzeln zu erfüllen.

Im Gegensatz zu *MATH1* sind singuläre *k.o.*-Linien für *MATH2* und *MATH3* lebensfähig. Aus der Kreuzung zwischen der *MATH2* und *MATH3* *k.o.*-Linie konnte jedoch keine lebensfähige Doppel-*k.o.*-Mutante hergestellt werden. Auch Samen, die heterozygot für ein Merkmal und homozygot für das andere Merkmal waren, sind nicht gekeimt. Im letzteren Fall war es dabei unerheblich, welches der beiden Merkmale homo- bzw. heterozygot war (Tab. 3.1). Beide Merkmale werden demnach kodominant vererbt. Der Phänotyp dieser nicht gekeimten F₂-Samen war ähnlich dem der *MATH1* *k.o.*-Samen. Es konnten normale Embryostrukturen mit zwei Kotyledonen und einer Achse gefunden werden. Diese wirkten im Vergleich zu den *MATH1* *k.o.*-Samen jedoch trocken und farblos (Abb. 3.5). Es könnte demnach sein, dass der Embryo unvollständig angelegt wird. Die Tatsache, dass auch der Genotyp, bei dem ein Merkmal homozygot und das andere heterozygot ist, embyoletal ist, deutet darauf hin, dass beide Proteine partiell miteinander interagieren könnten oder dass beide Proteine während dieser Entwicklungsphase bis zu einem bestimmten Grad redundant sein könnten.

4.1.2 Verändertes Spross:Wurzel-Biomasserverhältnis bei *MATH2* und *MAPK6 k.o.*-Mutanten

Wenn das *MATH2*-Gen inaktiviert ist, weisen die Pflanzen ein grösseres Verhältnis der Spross:Wurzel-Biomasse als im Vergleich zum WT auf (Abb. 3.4). Die *MAPK6 k.o.*-Mutante zeigt den entgegengesetzten Phänotyp. Eine Inaktivierung von *MAPK6* führt relativ zum Spross zu verstärktem Wurzelwachstum und dadurch zu einem verringertem Biomasseverhältnis Spross:Wurzel (Abb. 3.8).

Verstärktes Wurzelwachstum relativ zum Spross, das bei der *MAPK6 k.o.*-Mutante beobachtet wurde, wurde bisher ausschliesslich für Zytokinin-Mutanten beschrieben. Zytokinine regulieren die Zellteilung, die vor allem in den Meristemen stattfindet. Werner *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine Reduktion des endogenen Zytokiningehalts das Sprossapikalmeristem verringert und das Wurzelapikalmeristem vergrössert. Dadurch ist das Sprosswachstum reduziert und das Wurzelwachstum verstärkt. Darüberhinaus zeigten Mutanten, die durch Inaktivierung bestimmter Zytokinin-Rezeptoren nur partiell insensitive für exogenes Zytokinin sind, ein verstärktes Wurzelwachstum; ähnlich dem der Pflanzen mit verringertem endogenen Zytokiningehalt (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Zytokinine könnten folglich entgegengesetzte Rollen in der Regulation der Zellteilung in den Meristemen der Wurzeln und der Sprosse einnehmen.

Die Tatsache, dass eine Inaktivierung des *MAPK6*-Gens den gleichen Phänotyp hervorruft, der bei Mutanten mit reduziertem Zytokiningehalt beobachtet werden kann, lässt vermuten, dass *MAPK6* bei der Regulation des Zytokiningehalts beteiligt sein könnte. Folglich könnten die Zytokiningehalte in der *MAPK6*-Mutante ebenfalls reduziert sein. Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, ob *MAPK6* das verstärkte Wurzelwachstum direkt fördert oder ob *MAPK6* eher indirekt wirkt, indem sie andere Signalwege, wie vielleicht den Zytokininsignalweg, beeinflusst. Zumindest sind beide Faktoren, Zytokinine (Vadassery *et al.*, 2008) und, wie aus dieser Arbeit hervorgeht, *MAPK6* (Kapitel 4.2.4 und 4.4.2), an der Interaktion mit *P. indica* beteiligt. Eine künftige Untersuchung des endogenen Zytokiningehalts als auch des Wachstums der Apikalmeristeme in der *MAPK6 k.o.*-Mutante im Vergleich zum WT kann Aufschluss darüber geben, ob *MAPK6* an der Zytokininhomöostase beteiligt ist.

Dass die *MATH2*-Mutante hinsichtlich des Spross:Wurzel-Biomasseverhältnisses den entgegengesetzten Phänotyp zur *MAPK6*-Mutante aufweist könnte darauf hindeuten, dass beide Proteine untereinander in antagonistischer Weise auf die Zytokinin-Homöostase der Zellen wirken. Bei beiden Proteinen handelt es sich jedoch um sehr unterschiedliche Klassen

von Proteinen, die zudem funktionell und räumlich deutlich voneinander getrennt sind. Falls es eine Verbindung zwischen MATH2 und MAPK6 in ihrer Wirkung z.B. auf den endogenen Zytokiningehalt geben sollte, ist zu erwarten, dass eine Vielzahl weiterer Proteine, die wiederum in verschiedenen Signalkaskaden münden, beteiligt sind. Eine funktionelle Verbindung zwischen MATH2 und MAPK6 wäre dann eher indirekt. Bislang wurde eine Beteiligung beider Proteine in der Regulation der Zytokinaktivität noch nicht nachgewiesen.

4.1.3 *PDK1 d.k.o.*-Phänotyp

Für die 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) gibt es zwei Gene im *Arabidopsis*-Genom, *PDK1.1* und *PDK1.2*. Sie besitzen eine Sequenzhomologie von 92 % auf genomischer Ebene. Eine Inaktivierung entweder von *PDK1.1* oder *PDK1.2* brachte jeweils keinen auffälligen Phänotyp hervor. Dagegen zeigte die Doppel-*k.o.* (*d.k.o.*)-Mutante eine reduzierte Wachstumsrate während aller Entwicklungsstadien, die untersucht wurden (Samen, Keimlinge, adulte Pflanze, Schoten; Abb. 3.7). PDK1 scheint demnach die Wachstumsrate zu regulieren. Da die *d.k.o.*-Linie, aber nicht die beiden singulären *k.o.*-Linien diesen Phänotyp zeigen, sind die beiden Gene für dieses Protein in Bezug auf die Regulation der Wachstumsrate untereinander redundant.

4.2 Ko-Kultivierungsversuche

4.2.1 Ko-Kultivierung des WT mit *P. indica*

Um miteinander zu interagieren, müssen Pflanze und Pilz sich gegenseitig erkennen und Signalkaskaden in Gang setzen, woraus sich spezifische Reaktionen ergeben. Eine dieser Reaktionen der Pflanze auf einen mutualistischen Pilz ist ein gesteigertes Pflanzenwachstum, das als Biomassezunahme gemessen werden sollte. Dazu wurden neun Tage alte WT- als auch Mutanten-Keimlinge von *Arabidopsis* auf Phosphatmangelmedium mit und ohne (Kontrolle) *P. indica* ko-kultiviert (Abb. 3.9) und die Biomassezunahme nach Inokulation über einen Zeitraum von 10 Tagen alle zwei Tage gemessen. Damit sollte nicht nur das Ergebnis einer Ko-Kultivierung, also der Ausgang der Interaktion, sondern auch das Verhalten während der Etablierung dieser Interaktion beobachtet werden.

Anhand der aufgenommenen Wachstumskinetiken konnten in dieser Arbeit drei verschiedene Phasen der Interaktion als auch ihre zeitliche Abfolge definiert werden (Abb. 4.1).

Die erste Phase wird hier als Erkennungsphase bezeichnet. Sie findet in den ersten 4 Tagen nach Inokulation statt. In dieser Phase konnten noch keine Reaktionen der Pflanze auf den Pilz in Bezug auf eine Wachstumsantwort registriert werden. Alle Früherkennungsprozesse

sollten demnach in dieser Phase stattfinden; einschliesslich der Perzeption des von *P. indica* stammenden *Elicitors* und der daraus resultierenden frühen Signalprozesse, die der Pflanze das Vorhandensein von *P. indica* signalisieren. Bislang wurde das Signal von *P. indica* noch nicht identifiziert. Ab wann und ab welcher Konzentration *Arabidopsis* den *Elicitor* von *P. indica* innerhalb dieser Phase perzeptiert, ist daher ebenfalls noch nicht bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Erkennung in den ersten zwei Tagen oder nach zwei Tagen geschieht, da die ersten Signalprozesse in *Arabidopsis* ab zwei Tagen nach Inokulation nachweisbar sind. Dazu zählt die Hochregulation der Genexpression von LRR1, einer Rezeptorkinase, die das Signal von *P. indica* vermutlich erkennt (Vadassery *et al.*, 2009). Eine Zunahme der Transkriptmenge wurde darüberhinaus für *CDPK2*, -3 und -22 beobachtet, deren Genprodukte für Ca^{2+} -bindende Proteinkinasen kodieren (Saage, 2008) und vermutlich in die frühe Ca^{2+} -Antwort von *Arabidopsis* auf *P. indica* (Vadassery *et al.*, 2009) involviert sind.

Die zweite Phase der Interaktion wird hier als Etablierungsphase bezeichnet. Sie setzt 4 Tage nach Inokulation ein und dauert bis 8 Tage nach Inokulation. Die transiente Veränderung des Biomasseverhältnisses Spross:Wurzel 4 Tage nach Inokulation mit *P. indica* markiert den Beginn dieser zweiten Phase (Abb. 3.11). Der Anteil der Wurzel relativ zur gesamten Pflanze ist 4 Tage nach Inokulation durch den Pilz grösser als bei Kontrollpflanzen (ohne Pilz). In den darauffolgenden Tagen der Versuchsdurchführung glich sich dieses Verhältnis wieder aus und unterschied sich nicht mehr von den Kontrollpflanzen. Das bedeutet, dass sich der Wachstums-fördernde Effekt durch den Pilz zuerst in der Wurzel und darauffolgend auch im Spross bemerkbar macht, und dieses Phänomen war genau 4 Tage nach Inokulation zu beobachten. Im weiteren Verlauf dieser Phase nahm die Wachstumsförderung auf die gesamte Pflanze durch den Pilz immer mehr zu.

Nach 8 Tagen erreicht das Pflanzenwachstum ein Plateau. Die Zeit danach wird deshalb hier als eigentliche Interaktionsphase dieser Symbiose bezeichnet. Es findet im Wesentlichen kein weiteres Pflanzenwachstum und somit auch keine weitere Wachstumsförderung durch den Pilz mehr statt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Stagnation des Pflanzenwachstums zu dieser Zeit auf die begrenzte Grösse der Petrischalen zurückzuführen ist. Unter Bedingungen, bei denen den Pflanzen mehr Volumen für Wachstum zur Verfügung stehen würde, würde vermutlich weiterhin Wachstum stattfinden.

Zhao und Qi (2008) haben die Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen ebenfalls in drei Schritten definiert – Detektion, Signalweiterleitung, Reaktionen –, die der Einteilung in die in dieser Arbeit beschriebenen Phasen ähnlich ist. Zudem konnten in dieser hier vorgestellten Arbeit die Zeitfenster, in denen diese Phasen stattfinden, herausgearbeitet

werden. Sie waren für die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* innerhalb dieses Modellsystems bisher unbekannt. Diese zeitliche Festlegung erlaubt es, die stattfindenden Signalprozesse den einzelnen Phasen zuzuordnen und somit ihre Funktion zu etablieren (Abb 4.1).

Obwohl *P. indica* in den meisten Ko-Kultivierungsversuchen Wachstumsförderung bei den Pflanzen (WT) hervorrief, reagierten die Pflanzen trotz identischer Versuchsbedingungen in einigen Versuchen nicht mehr, in seltenen Fällen wurde sogar Wachstumsinhibition beobachtet (Kapitel 3.2.1). Auch war das Ergebnis der Interaktion in Bezug auf die Wachstumsrate nie vorhersehbar und ereignete sich scheinbar eher zufällig. Die Signalwege der beiden Partner, die diesem Prozess der Interaktion zugrunde liegen, könnten daher sehr komplex zu sein und aus mehreren möglichen Routen bestehen (Kapitel 4.2.2).

Wie ist das zu erklären? Das Verständnis vom Mutualismus wandelte sich im Laufe der Zeit. Ursprünglich wurde Mutualismus als ein Mechanismus verstanden, der auf den individuellen Interessen jedes Partners basierte. 1885 wurde durch Albert Bernhard Frank der Begriff “Mykorrhiza” geprägt und im Zusammenhang damit das Bevorzugen der Interaktion der beteiligten Partner in der Evolution postuliert. Im Laufe der Zeit häuften sich immer mehr Beweise, die Strategien vom “Überlisten und Ausbeuten” belegen (Bronstein, 2001). Daraus folgte, dass Mutualismus seit dieser Jahrhundertwende als balancierter reziproker Parasitismus verstanden wird (Egger und Hibbett, 2004), der anfällig ist für Interessenkonflikte, die die symbiotische Assoziation destabilisieren können (Hibbet *et al.*, 2000). Somit vollzog sich ein Paradigmenwechsel vom “Bevorzugen der Assoziation” statt der “individuellen Interessenvertretung der beteiligten Partner” zum “balancierten reziproken Parasitismus”, wodurch das Konzept des symbiotischen Kontinuums wiederbelebt war. Dieses Konzept beschreibt die mutualistische Interaktion als einen Mittelstatus zwischen dem Parasitismus durch den Pilz bzw. Mikroorganismus und dem Parasitismus durch die Pflanze (Johnson *et al.*, 1997; Egger und Hibbet, 2004; Mandyam und Jumpponen, 2005; Schulz und Boyle, 2005). Es finden in einer mutualistischen Symbiose folglich auch Abwehrreaktionen der Pflanze statt (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Salzer und Boller, 2000), welche sich mit dem Nährstoffbedarf des Pilzes in einer genau abgestimmten Balance befinden. Ist die Interaktion unbalanciert, resultieren Krankheitssymptome oder der Pilz wird von Abwehrreaktionen der Wirtspflanze abgestossen (Schulz und Boyle, 2005; Kogel *et al.*, 2006).

Damit weist die Symbiose von Pflanzen mit nützlichen oder neutralen Pilzen auf molekularer Ebene Gemeinsamkeiten mit Interaktionen von Pflanzen mit Pathogenen während der Etablierung dieser Interaktion auf (Zhao und Qi, 2008). Die Induktion der Expression von

Abwehrgenen findet meist im frühen Stadium der Penetration bzw. Kolonisierung statt (Garcia Garrido und Ocampo, 2002; Grunwald *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die Aktivierung und Regulation dieser Abwehrreaktionen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des mutualistischen Status der Assoziation spielt. Die induzierten Abwehrreaktionen könnten dabei am Abbau des *Elicitors*, der Modulation der Konzentration von sekundären Botenstoffen, Nährstoff- und Hormon-abhängiger Abwehrregulation und der Induktion von regulatorischen Genen für den Aufbau der Symbiose beteiligt sein (Garcia Garrido und Ocampo, 2002).

Im weiteren Verlauf einer mutualistischen Interaktion werden die Abwehrreaktionen unterdrückt (Ruiz-Lozano *et al.*, 1999), was vermutlich auf die fein abgestimmte Balance in diesen Interaktionen zurückzuführen ist, die diese Reaktionen in einem *steady state*-Zustand halten, bei dem beide Partner nicht beeinträchtigt werden.

Was die Evolution von Wurzel-Pilz-Assoziationen betrifft, sind sie definiert durch den Vorteil, den sie zur Fitness der jeweiligen Partner über Lebenszeiten oder Generationen beitragen. Es könnte sein, dass Mycorrhizen durch eine Reihe von Stadien entstehen und vergehen; von der Etablierung über ein Stadium des balancierten reziproken Parasitismus bis zum Zusammenbrechen in nicht-reziproken Parasitismus oder ihrer Auflösung (Egger, 2006). Hibbett *et al.* (2000) vermuten, dass die mutualistische Mycorrhiza aus der Interaktion mit saprophytischen Pilzen abstammen kann.

Darüberhinaus scheinen endophytische Assoziationen, bei denen die Interaktion leichter zwischen Mutualismus und Antagonismus kippen kann, ebenso verbreitet zu sein wie Mycorrhizen (Mandyam und Jumpponen, 2005). Die Untersuchung endophytischer Assoziationen könnte helfen, besser zu verstehen, was zu mutualistischen Wurzel-Assoziationen beiträgt. Auch die Unterscheidung zwischen einer Mycorrhiza und einer endophytischen Symbiose ist nicht so eindeutig wie bisher angenommen (Egger, 2006). Für den mutualistischen Endophyten *P.indica* konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass er vorrangig älteres Wurzelgewebe seines Wirts kolonisiert. Die meisten Hyphen befinden sich dabei in toten Zellen der Rhizodermis und des Wurzelkortex, die vollständig mit Chlamydosporen gefüllt sind. Es wird daher angenommen, dass der Endophyt mit dem Zelltod seines Wirts interferiert, um die mutualistische Symbiose zu etablieren (Deshmukh *et al.*, 2006).

Antagonistische Interaktionen bzw. ein Kippen von einer mutualistischen Interaktion in eine antagonistische konnte auch bei AM beobachtet werden (Modjo und Hendrix, 1986; Guo *et al.*, 1994; Janos, 1996).

Der Wechsel zwischen Mutualismus und Parasitismus innerhalb einer Interaktion kann von den Umweltfaktoren abhängen (Kuldau und Yates, 2000; Egger, 2006). Aufwand und Nutzen fluktuieren entsprechend der biotischen und abiotischen Bedingungen (Bronstein, 1994). Steht einer der beiden Partner z.B. unter Stress, kann die Interaktion kippen (Schulz und Boyle, 2005). Rudgers und Swaffold (2007) konnten zeigen, dass das Gras *Elymus virginicus* in Symbiose mit pilzlichen Endophyten eine höhere Biomasseproduktion aufweist. Der Nutzen durch pilzliche Endophyten in *Elymus virginicus* nimmt jedoch unter Trockenstress ab. Auch die biotischen Bedingungen können den Ausgang der Interaktion modifizieren. Kaldorf *et al.* (2005) konnten zeigen, dass das Interaktionsmuster zwischen einem hybriden Pappelclon (*Populus Esch5*) und *P. indica* von Mutualismus zu Antagonismus übergehen kann, wenn die Setzlinge mit dem Pilz wiederholt kultiviert wurden. Auch Schulz *et al.* (1998) konnten zeigen, dass eine Re-infektion von Endophyten Krankheitssymptome bei den Wirtspflanzen verursachten, wenn die Endophyten zuvor bei einer erstmaligen Infektion keine Symptome zeigten.

Damit konnte gezeigt werden, dass veränderte Umweltbedingungen den Ausgang einer Symbiose verändern können. Das erklärt jedoch noch nicht, warum die Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* in dem hier verwendeten Versuchssystem in unterschiedlichen Wachstumsantworten der Pflanzen resultierten. Die Versuche wurden immer identisch durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass eher der Pilz als die Pflanzen den Ausgang der Interaktion bestimmen könnten. Der Pilz könnte verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen (Schulz *et al.*, 1998), die bisher noch nicht gut genug bekannt sind und die direkt nicht zu erkennen waren. Da Pilze durch ihre auf Absorption eingestellte Lebensweise eine hohe Wachstumsrate besitzen, ist es auch möglich, dass das in den verschiedenen Versuchen verwendete Pilzmycel von verschiedenen Zellkernen abstammte, die untereinander ausreichend divergent waren.

4.2.2 Ko-Kultivierung der *MATH2* und *MATH3 k.o.*-Linie mit *P. indica*

Da das Ausschalten des Gens für MATH1 Samen hervorbringt, die nicht mehr keimen können (Kapitel 4.1.1), konnte eine entsprechende *k.o.*-Linie nicht in der Interaktion mit *P. indica* getestet werden.

Die beiden *k.o.*-Linien für MATH2 bzw. MATH3 wurden dagegen in der Interaktion mit dem Pilz getestet.

Die *MATH2 k.o.*-Linie verhielt sich in Bezug auf die Wachstumsreaktion auf den Pilz reziprok zum WT. Je besser der Pilz das Wachstum beim WT förderte, desto weniger

reagierte die Mutante. Je weniger der Pilz das Wachstum beim WT förderte bzw. je mehr er das Wachstum behinderte, desto positiver reagierte die Mutante. Die *MATH3* *k.o.*-Linie verhielt sich ebenfalls reziprok zum WT in Bezug auf die Wachstumsreaktion auf *P. indica* (Kapitel 3.2.2).

Somit sind MATH2 und MATH3 an der Interaktion mit *P. indica* unter Bedingungen, in denen beim WT ein positiver Wachstumseffekt durch den Pilz zu verzeichnen ist, beteiligt. Beide Proteine sind damit untereinander in Bezug auf die Interaktion, als auch gegenüber MATH1, nicht redundant.

Der beschriebene komplementäre Effekt beider *k.o.*-Linien in der Reaktion auf den Pilz gegenüber dem WT könnte mit Aspekten, die aus der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen bekannt sind, erklärt werden. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit untersuchten Interaktion sind Pflanze-Pathogen-Interaktionen antagonistisch. Dabei könnte das Verständnis der Mechanismen, die evolutionär zum Übergang zwischen mutualistischen bzw. neutralen und antagonistischen Interaktionen geführt haben, helfen, den Effekt der beiden *k.o.*-Linien in der Interaktion mit *P. indica* besser zu verstehen.

Interaktionen von Pflanzen mit Pathogenen werden in Nicht-Wirtresistenz, Basalkompatibilität oder Wirt-abhängige Resistenz unterteilt. Nichtwirtresistenz (auch angeborene Immunität oder basale Resistenz) ist dabei die in der Natur vorherrschende Form der Resistenz gegen Pathogene. Sie besagt, dass die meisten Pflanzenarten resistent gegen die meisten Pathogene sind (Dangl und Jones, 2001; Heath, 2000). Es handelt sich um eine unspezifische und dauerhafte Abwehrform und stellt die erste Abwehrlinie gegen eine mikrobielle Invasion dar (Nürnberger *et al.*, 2004). Wichtig ist, dass sie ein breites Spektrum an konstitutiven und induzierbaren Elementen beinhaltet (Heath, 2001). Durch Ko-Evolution von Pflanzen und Pathogenen können die Mikroorganismen in wenigen Fällen durch Evolution sogenannter Effektorproteine diese Abwehrlinie durchbrechen. Diese Effektorproteine interferieren mit Elementen der Nicht-Wirtresistenz und erniedrigen oder verhindern somit die Abwehr der Pflanze. Die Pflanze kann sich nicht mehr ausreichend verteidigen und es kommt zur Krankheit. Dieses Phänomen wird als Basiskompatibilität bezeichnet. Durch den daraus resultierenden Evolutionsdruck erfolgreicher Pathogene auf susceptible Pflanzen in der Basiskompatibilität können Kultivare dieser Pflanzenart wiederum eine spezifische Resistenz gegen spezifische Rassen oder Kultivare des Pathogens durch Evolution von *R* (Resistenz)-Genen erwerben (Baker *et al.*, 1997; Shirasu und Schulze-Lefert, 2000; Staskawicz *et al.*, 2001; Hammond-Kosack K, Parker, 2003).

Kann ein Pathogen eine Pflanzenart nicht erfolgreich kolonisieren, unabhängig davon, ob durch Nicht-Wirt- oder Wirt-abhängige Resistenz, wird die Interaktion als inkompatibel, das Pathogen als avirulent und die Pflanze als resistent bezeichnet. Bei einer erfolgreichen Kolonisierung des Wirts ist die Interaktion dagegen kompatibel, das Pathogen virulent und die Pflanze suszeptibel.

Abgeleitet davon kann man die mutualistische Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* als Basis-kompatibel bezeichnen, da *Arabidopsis* kein spezifischer Wirt für *P. indica* ist, der Pilz die Wurzeln der Pflanze jedoch erfolgreich kolonisiert (Varma *et al.*, 1999; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Die Nicht-Wirtresistenz konnte also durchbrochen werden. Im Unterschied zum Pathogenbefall kommt es hierbei jedoch nicht zum Krankheitsverlauf, sondern meist zu einer mutualistischen Interaktion, von der beide Partner profitieren. Da bei der Nicht-Wirtresistenz eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert werden, ist es möglich, dass auch für das Erreichen der Basiskompatibilität in einer mutualistischen Interaktion nicht nur ein, sondern mehrere dieser Signalwege, die den Mikroorganismus abwehren, in der Evolution durchbrochen bzw. abgewandelt werden (Kistner and Parniske, 2002). Dies ist vor allem deshalb wahrscheinlich, da die Pflanzen bei dieser Art der Interaktion keinem Evolutionsdruck ausgesetzt sind, der das Hervorbringen einer Wirt-abhängigen (Gen-für-Gen)-Resistenz notwendig macht. Somit könnte auch die mutualistische Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* auf evolutionär unterschiedlichen Signalwegen beruhen. Das ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass das Signal, das von *P. indica* stammt, sich vermutlich aus mehreren Komponenten zusammensetzt (Vadassery *et al.*, 2009). Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich diese Umwandlungen der Signalwege evolutionär zu verschiedenen Zeiten entwickelten. Je nach individueller Interaktion könnten dabei während der Ko-Kultivierungsversuche verschiedene dieser Signalwege aktiviert werden bzw. dominieren. Welcher Signalweg dabei aktiviert wird, könnte von den Signalen des Pilzes abhängen.

Dass die beiden *k.o.*-Linien, *MATH2 k.o.* und *MATH3 k.o.*, einen komplementären Effekt gegenüber dem WT in Bezug auf die Wachstumsrate durch den Pilz zeigten, lässt vermuten, dass die Proteine nur in einige Signalwege involviert sein könnten, in andere nicht. Diese werden dann entweder unterschiedlich aktiviert oder konkurrieren miteinander. Die beiden Proteine MATH2 und MATH3 könnten in Signalwege involviert sein, die zu einer starken Wachstumsförderung durch den Pilz führen. Im Gegenzug könnten sie die Interaktion bis zu einem gewissen Grad behindern, wenn der WT keine oder eine negative Wachstumsantwort auf den Pilz zeigt, da die Mutanten, in denen MATH2 bzw. MATH3 fehlen, in diesem Fall in

Anwesenheit des Pilzes besser wachsen als der WT. Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass die beiden MATH-Proteine in verschiedenen Signalwegen verschiedene Funktionen erfüllen. Verschiedene Funktionen könnten z.B. durch verzweigte Signalkaskaden zustande kommen.

Es ist demnach anzunehmen, dass es sich bei den untersuchten MATH-Proteinen um evolutionär eher junge Proteine handelt, die sich erst nach Diversifikation verschiedener Signalwege entwickelt haben (Kapitel 4.7).

4.2.3 Ko-Kultivierung der *PDK1* *k.o.*-Linien mit *P. indica*

Die *PDK1 d.k.o.*-Mutante wies unter Standardwachstumsbedingungen während verschiedener Entwicklungsstadien ein verringertes Wachstum gegenüber dem WT auf (Kapitel 4.1.4). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PDK1 an der Regulation des Wachstums der Pflanze beteiligt ist. Bei Ko-Kultivierungsversuchen mit *P. indica* wurde ein weiterer phänotypischer Unterschied zum WT beobachtet. Wenn beim WT Wachstumsförderung durch *P. indica* auftrat, zeigte die parallel ko-kultivierte *PDK1 d.k.o.*-Mutante grosse Variabilität in ihrer Reaktion auf den Pilz. Sie reagierte entweder weniger oder stärker als der WT auf *P. indica*. Der Grenzwert, ab dem die Mutante im Vergleich zum WT entweder stärker oder schwächer reagierte, lag bei 110 % Wachstumsförderung im WT. Wenn der WT mit mehr als 110 % Wachstumsförderung reagierte, reagierte die Mutante stärker. Wenn beim WT weniger als 110 % Wachstumsförderung zu verzeichnen waren, reagierte die *d.k.o.*-Mutante graduell schwächer; d.h. je geringer die Wachstumsförderung im WT unter diesem Grenzwert lag, desto weniger als der WT reagierte die Mutante. Bei einer Wachstumsförderung von weniger als etwa 80 % im WT reagierte die Mutante sogar gar nicht mehr.

Die beiden singulären *k.o.*-Linien *PDK1.1 k.o.* und *PDK1.2 k.o.* verhielten sich im Unterschied zur *PDK1 d.k.o.*-Mutante genauso wie der WT in der Reaktion auf den Pilz; unabhängig davon, ob der WT mit Wachstumsförderung, nicht mehr oder mit Wachstumsinhibition reagierte. Demnach sind die beiden singulären *k.o.*-Linien auch in der Reaktion auf den Pilz untereinander redundant (Kapitel 3.2.2).

Aus der Reaktion der *d.k.o.*-Mutante während der Interaktion mit *P. indica* im Vergleich zum WT lässt sich die Aussage, die sich bereits aus dem Phänotyp dieser Mutante ergeben hat, somit erweitern. Die Daten der Interaktionsversuche lassen vermuten, dass die Regulation des Wachstums nicht nur in einer Richtung, sondern sowohl positiv als auch negativ sein kann. Wachstum und Entwicklung bedeuten nicht nur, dass die Pflanze ihre gesamte Energie für Zellteilung und Zellstreckung verwendet, sondern auch für andere Prozesse zur Verfügung

stellt, die für die gesamte Fitness der Pflanze notwendig sind. Für all diese Prozesse ist deshalb immer eine Gegenwirkung notwendig. Es könnte sein, dass PDK1 diese Homöostase aufrecht erhält. In Säugern reguliert PDK1 die Balance zwischen Zellteilung, Zellwachstum und Apoptose (Alessi, 2001; Storz und Toker, 2002; Mora *et al.*, 2004), was somit dieser postulierten Funktion in Pflanzen entsprechen würde.

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Aus *Array*-Daten geht hervor, dass PDK1 in allen Geweben exprimiert ist. Dabei ist das Expressionsniveau von *PDK1.1* (*eFP browser*, *Probe set ID*: 250848_at) gegenüber *PDK1.2* (*eFP browser*, *Probe set ID*: 258964_at) grundsätzlich etwas höher. Es gibt lediglich eine Unterscheidung in der Verteilung ihrer Expressionsmaxima bei der Keimbahnentwicklung. Während *PDK1.1* im Stigma und den Ovarien exprimiert wird, wird *PDK1.2* vor allem in den Pollen in der zweiten Entwicklungshälfte exprimiert.

Aus Säugern ist bisher bekannt, dass PDK1 sich im inaktiven Zustand als lösliches Protein im Cytosol befindet. Sobald ein entsprechendes Signal an der Plasmamembran entsteht, wird PDK1 dorthin rekrutiert und bindet mit seiner PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie-Domäne), einer Lipid-Bindedomäne, an die jeweiligen Phospholipide (Komander *et al.*, 2004). PDK1 autophosphoryliert und aktiviert daraufhin Kinasen der AGC (cAMP-abhängige, cGMP-abhängige Proteinkinase C-(PKC))-Familie, die somit ebenfalls an die Plasmamembran transloziert werden. PDK1 dient damit als funktionelle Verbindung zwischen Signalen, die an der Membran entstehen und damit eingeleiteten Signalkaskaden. Es existieren wenige Signalwege, in denen PDK1 im Cytosol bleibt, um AGC-Kinasen zu aktivieren (Komander *et al.*, 2004).

Auch in *Arabidopsis* konnte nachgewiesen werden, dass PDK1 an Phosphatidsäure (PA) bindet (Anthony *et al.*, 2006) und mit verschiedenen AGC-Kinasen interagiert. Insgesamt gibt es in *Arabidopsis* 39 AGC-Kinasen (Bögre *et al.*, 2003). Diese werden im Gegensatz zu PDK1 eher Gewebe- und Stimulus-spezifisch aktiviert bzw. induziert, wodurch wiederum verschiedene Signalwege aktiviert werden (Zegzouti *et al.*, 2006 b). Auf diese Weise spezifiziert sich das Signal, das über PDK1 vermittelt wird. Einige PDK1-aktivierte AGC-Kinasen in *Arabidopsis* sind z.B. OXI1 (Anthony *et al.*, 2004 und 2006), PID (Zegzouti *et al.*, 2006 a) und die S6-Kinase (Otterhag *et al.*, 2006). Sie sind in die Pathogenabwehr (OXI1), den Auxinsignalweg (OXI1, PID), den Zytokininsignalweg (OXI1), in Schlüsselsignalwege, die als Knotenpunkt für die Integration von Hormon- und Entwicklungssignalen fungieren (S6-Kinase), oder in Kälte- und Salzstress (S6-Kinase) einbezogen.

Aus dem Zusammenwirken der AGC-Signalwege, in denen PDK1 als Knotenpunkt zu fungieren scheint, könnte die Balance der Wachstumsregulation und der anderen Prozessen erklärt werden. Somit könnte PDK1 die Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Pilz kontrollieren, indem sie die Balance zu anderen Stoffwechsel- oder Signalprozessen der Pflanze aufrecht erhält. Die Daten deuten darauf hin, dass die Rolle von PDK1 in der Interaktion mit *P. indica* eher unspezifisch zu sein scheint.

Dieser Phospholipid-PDK1-AGC-Signalweg existiert sowohl in Tieren als auch in Pflanzen. In beiden Reichen erfüllt er darüberhinaus offensichtlich ähnliche Funktionen. Dieser Signalweg ist damit evolutionär alt und konserviert (Mora *et al.*, 2004). Daraus erklärt sich auch, weshalb sich die Reaktion der Mutanten im Vergleich zum WT bei verschiedenen Ausgängen der Interaktion im Gegensatz zu den *MATH k.o.*-Linien nicht ändert (Kapitel 3.2.2).

4.2.4 Ko-Kultivierung der *MAPK6 k.o.*-Linie mit *P. indica*

Die *MAPK6 k.o.*-Linie reagierte nicht mehr auf den Pilz; unabhängig davon, ob der Pilz beim WT Wachstumsförderung, keine Reaktion oder Wachstumsinhibition hervorrief (Kapitel 3.2.2). Die Kinase ist somit entscheidend für die Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Pilz während der zweiten Phase der Interaktion, in der die Symbiose etabliert wird (Kapitel 4.2.1). MAPK6 ist eine Kinase, die durch eine Vielzahl von Signalen aktiviert und anschliessend vom Cytosol zu cytosolischen oder Kern-lokalisierten Transkriptionsfaktoren transloziert wird, um diese zu aktivieren und phosphorylieren (Kapitel 1.3.3). Diese Kinase könnte auch in dieser Interaktion als Knotenpunkt für mehrere Signalprozesse agieren und so für die Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Pilz verantwortlich sein (Kapitel 4.4.2).

Beim MAPK-Kaskademodul handelt es sich generell um einen sehr alten und hoch konservierten Regulationsmechanismus, der funktionell in sehr unterschiedliche Prozesse involviert ist. Dies erklärt, warum sich die Reaktion der *k.o.*-Mutante bei verschiedenen Ausgängen der Interaktion nicht ändert, was im Gegensatz dazu bei den *MATH k.o.*-Linien beobachtet werden konnte (Kapitel 4.2.2).

4.3 Kolonisierung

Während der Kolonisierung der Pflanze durch den Pilz wachsen die Hyphen des Pilzes um die Wurzeln und in die Wurzeln hinein. Es bildet sich ein Pilzmycel aus. Dieses geht mit der Bildung von Sporen einher. Die in dieser Arbeit untersuchten *k.o.*-Linien wurden hinsichtlich ihres Kolonisierungsgrades durch *P. indica* im Vergleich zum WT untersucht. Dabei wurden

nur die Versuche ausgewertet, bei denen der WT parallel zu den *k.o.*-Linien eine Wachstumsförderung nach Ko-Kultivierung zeigte. Damit sollte ermittelt werden, ob die entsprechenden Proteine eine Rolle bei der Kolonisierung spielen.

Bis auf die *MAPK6 k.o.*-Linie waren alle anderen Mutanten (*MATH2 k.o.*, *MATH3 k.o.*, *PDK1.1 k.o.*, *PDK1.2 k.o.*, *PDK1 d.k.o* und *MAPK3 k.o.*) weniger durch den Pilz kolonisiert als der WT; scheinbar unabhängig davon, ob die entsprechenden Proteine verantwortlich sind für die Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Pilz oder nicht (Abb. 3.19). Die stärkste Reduktion des Kolonisierungsgrades konnte bei der *MATH2 k.o.* und *MAPK3 k.o.*-Mutante verzeichnet werden. Somit stimmt die Wachstumsförderung nicht mit dem Grad der Kolonisierung überein. Umgekehrt hängt ein Ausbleiben der Wachstumsreaktion in den Mutanten nicht zwangsläufig mit einer verminderten Kolonisierung zusammen. Die Unterscheidung zwischen der Kolonisierungsrate und der Wachstumsantwort auf den Pilz fällt besonders bei der *MAPK3* und *MAPK6 k.o.*-Linie auf. Während die *MAPK3 k.o.*-Linie eine Wachstumsantwort auf den Pilz zeigt (Kapitel 3.2.2), ist die Kolonisierung deutlich geringer als im WT. Die *MAPK6 k.o.*-Linie zeigt keine Wachstumsreaktion auf den Pilz (Kapitel 3.2.2), wird aber nahezu genauso wie der WT vom Pilz kolonisiert. Während *MAPK3* eine Rolle bei der Kolonisierung spielen könnte, scheint *MAPK6* dagegen eher in die Wachstumsreaktion auf den Pilz verantwortlich zu sein.

4.4 Expressionsanalyse

Bei den Ko-Kultivierungsversuchen wurde das zeitliche Expressionsmuster von *MATH1*, *MATH2*, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3* und *MAPK6* untersucht. Dabei wurde der gesamte Zeitraum von 0 bis 10 Tage nach Inokulation erfasst. Zusätzlich wurde die Expression von *OXII*, dessen Genprodukt ein Substrat von *PDK1* ist und das durch Pathogenbefall induziert wird (Anthony *et al.*, 2006) und von *LOXI*, einem Abwehrgen, untersucht.

Das Material stammte aus den Wurzeln der Pflanzen aus den Ko-Kultivierungsversuchen.

4.4.1 Regulation der Genexpression von *MATH1*

MATH1 ist in den Wurzeln während der Interaktion mit *P. indica* so gut wie nicht reguliert. Lediglich nahm die Genexpression bis 4 Tage nach Inokulation geringfügig ab, und daraufhin 6 und 8 Tage nach Inokulation geringfügig zu. 10 Tage nach Inokulation war eine geringfügige Veränderung der Genexpression gar nicht mehr festzustellen. *MATH1* wird in

den Wurzeln allgemein sehr hoch exprimiert. Auch auf Proteinebene ist MATH1 sehr hoch abundant.

4.4.2 Regulation der Genexpression von *MATH2*, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3* und *MAPK6*

MATH2, *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2*, *MAPK3* und *MAPK6* zeigten qualitativ das gleiche zeitliche Expressionsmuster in den Wurzeln während der Interaktion mit *P. indica* (Kapitel 3.2.4). Die Stärke der Regulation war jedoch unterschiedlich. Alle diese Gene wurden durch *P. indica* transient hochreguliert. Die Hochregulation der mRNA begann 4 Tage nach Inokulation und nahm bis 8 Tage nach Inokulation immer mehr zu, so dass die maximale Expressionsrate 8 Tage nach Inokulation erreicht war. Danach nahm die Transkriptmenge wieder ab und die Gene wurden im darauffolgenden Zeitverlauf nicht mehr reguliert. Betrachtet man den Grad der Regulation, so wurde eine deutliche Induktion der Genexpression (\geq Faktor 2) nur bei *MATH2* und *MAPK3* beobachtet. Von *MAPK3* ist bekannt, dass sie innerhalb der Familie der MAPKs die einzige MAPK ist, die auch auf Transkriptebe Ebene reguliert wird. Alle anderen MAPKs werden vorrangig posttranslational reguliert (Hamel *et al.*, 2006). Dies konnte somit während der Interaktion mit *P. indica* ebenfalls bestätigt werden. *MATH3*, *PDK1.1*, *PDK1.2* und *MAPK6* zeigten dagegen nur eine schwache Regulation.

Somit sind alle diese Gene in der zweiten Phase der Interaktion, in der die Symbiose etabliert wird, transient hochreguliert. Sie sind damit für den Aufbau der Symbiose wichtig (Abb. 4.1). Basierend auf den Expressionsdaten kann weiterhin vermutet werden, dass sie weder während der Früherkennung des Pilzes durch die Pflanze noch während der eigentlichen symbiotischen Interaktion im späteren Zeitverlauf eine Rolle spielen. Auf Proteinebene konnte allerdings beobachtet werden, dass *MAPK3* und *MAPK6* in *Arabidopsis*-Wurzeln nach Zugabe eines Zellwandextrakts (ZWE) von *P. indica* transient phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung ist abhängig vom cytosolischen Ca^{2+} -Einstrom, der durch die Perzeption des ZWE verursacht wird (Vadassery *et al.*, 2009). Somit sind beide MAPKs sowohl in frühe Erkennungssignalwege, als auch in den Aufbau der Symbiose involviert. Da MAPKs ein sehr konserviertes und zentrales Regulationsmodul innerhalb des Netzwerkes von Signalwegen darstellen ist zu erwarten, dass sie in dieser Interaktion noch weitere, bisher unbekannte Funktionen erfüllen.

Es konnten keine Unterschiede in der Regulation der Expression der untersuchten Gene bei verschiedenen Ausgängen der Interaktion (Wachstumsförderung, keine Reaktion oder

Wachstumsinhibition) festgestellt werden. Die entsprechenden Genprodukte sind somit verantwortlich für die “Kommunikation” mit dem Pilz während der Etablierung der Symbiose, entscheiden aber nicht darüber, ob Pflanzen auf den Pilz mit Wachstumsförderung reagieren oder nicht.

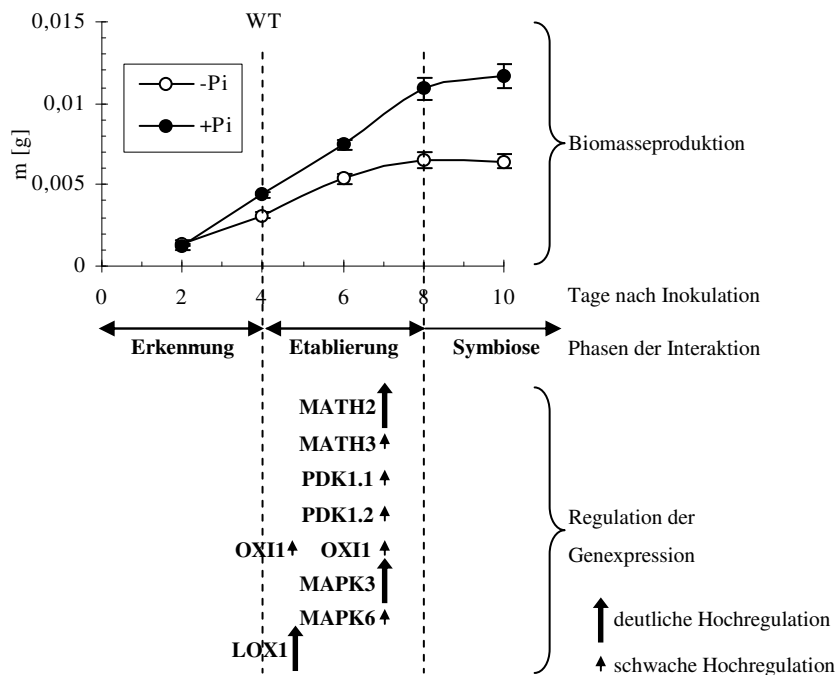


Abb. 4.1: Schema der Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica*. Dargestellt ist die Biomassezunahme in den Wurzeln bei positiver Wachstumsreaktion auf den Pilz in Kombination mit der Regulation der Genexpression untersuchter Gene in den Wurzeln. Die Interaktion ist dabei in drei Phasen unterteilt.

4.4.3 Regulation der Genexpression von *OXI1*

OXI1 wird bei Pathogenbefall induziert und kodiert für ein Protein, das ein Substrat von PDK1 ist. *OXI1* agiert stromaufwärts von MAPK3 und -6 (Anthony et al., 2004 und 2006). Die Expression dieses Gens wurde ebenfalls im gesamten hier betrachteten Verlauf der Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* untersucht.

Auch *OXI1* zeigte nur eine sehr schwache Hochregulation der Genexpression in den Wurzeln 4, 6 und 8 Tage nach Inokulation. Dieses Gen war somit am Übergang zwischen Erkennungs- und Etablierungsphase und während der darauffolgenden Etablierungsphase gleichermassen schwach hochreguliert (Abb. 4.1). Damit unterscheidet sich das zeitliche Expressionsmuster von *OXI1* während der Interaktion mit *P. indica* von dem von *PDK1* und *MAPK3* und -6. Es wäre jedoch zu erwarten, dass der PDK1-*OXI1*-MAPK3/6-Signalweg auch in der mutualistischen Interaktion mit *P. indica* aktiviert und *OXI1* folglich genauso wie *PDK1* und *MAPK3* und -6 induziert wird. Dass *OXI1* trotzdem ein anderes zeitliches Expressionsmuster zeigt, kann bedeuten, dass die Expression von *OXI1* zwar zusammen mit den anderen Genen,

zusätzlich jedoch noch durch einen weiteren Stimulus 4 Tage nach Inokulation schwach induziert wird. *OXI1* würde in diesem Fall über zwei verschiedene Routen in dieser Interaktion involviert sein. In diesem Fall würden sich zwei verschiedene Expressionsmaxima Zeit-versetzt etwas überlagern. *OXI1* wird unabhängig von PDK1 noch durch *oxidative burst* aktiviert (Anthony *et al.*, 2006). Die Bildung von H_2O_2 konnte direkt nach Zugabe eines ZWE von *P. indica* auf *Arabidopsis*-Wurzeln jedoch nicht nachgewiesen werden (Vadassery *et al.*, 2009). Es ist allerdings möglich, dass *oxidative burst* in dieser Interaktion stattfindet, jedoch zeitverzögert und/oder deutlich schwächer (s. *LOX1*, Kapitel 4.4.4), so dass diese Reaktion unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Induktion der Genexpression von *OXI1* war wieder unabhängig vom Ausgang der Interaktion. *OXI1* ist damit ebenfalls nicht dafür verantwortlich dafür, mit welcher Wachstumsreaktion die Pflanze auf den Pilz reagiert.

4.4.4 Regulation der Genexpression von *LOX1*

Lipoxygenase 1 (LOX1), die für ein Abwehrgen kodiert, wurde 4 Tage nach Inokulation in den Wurzeln transient hochreguliert, d.h. genau am Übergang zwischen Erkennungs- und Etablierungsphase. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Genen konnte diese Hochregulation nur beobachtet werden, wenn die Pflanzen durch den Pilz grösser wurden. Bei einer Wachstumsinhibition durch den Pilz wurde sie nicht hochreguliert bzw. wurde sie kaum reguliert, wenn die Pflanzen keine Wachstumsreaktion zeigten (nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass die Interaktion der Pflanze mit dem Pilz dann mutualistisch wird, wenn die Pflanze stärkere Abwehrmechanismen hochfährt.

Abwehrreaktionen in mutualistischen Interaktionen laufen meist lokal begrenzt und in frühen Phasen der Interaktion ab. Sie werden im weiteren Verlauf der Interaktion unterdrückt (Kapitel 4.2.1). Damit scheint es zusammenzuhängen, dass *LOX1* nur nach 4 Tagen und anschliessend nicht mehr hochreguliert ist. Es ist davon auszugehen, dass weitere Abwehrreaktionen stattfinden, die ebenfalls in diesem Zeitfenster ablaufen könnten. Somit würde die Pflanze, nachdem sie den Interaktionspartner wahrgenommen und erkannt hat, zunächst Abwehrreaktionen starten. Bei einer mutualistischen Interaktion würden diese im weiteren Verlauf herunterreguliert werden (Ruiz-Lozano *et al.*, 1999) und der Aufbau der Symbiose starten. Diese Überwindung der Abwehrreaktionen könnte auch mit dem Interferieren von Effektorproteinen des Interaktionspartners einhergehen, die ursprünglich in der Evolution zur Entstehung dieser Basiskompatibilität geführt hat (Kapitel 4.2.2).

Lipoxygenasen sind Dioxygenasen, die die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren katalysieren, was zur Bildung von Fettsäurehydroperoxiden führt. LOX spielen neben anderen Prozessen auch in der Pathogenabwehr eine Rolle (Porta und Rocha-Sosa, 2002). In der Pathogenabwehr sind sie an der Aktivierung von Signalwegen und der Auslösung der hypersensitiven Reaktion beteiligt und besitzen eine antimikrobielle Wirkung (Maccarone *et al.*, 2000; Porta und Rocha-Sosa, 2002).

Es ist möglich, dass es einen Zusammenhang zwischen der LOX-Aktivität und der schwachen Induktion von *OXII* in der Reaktion auf *P. indica* in *Arabidopsis* gibt. Beide Proteine sind in der Pathogenabwehr an den *oxidative burst* gekoppelt und werden 4 Tage nach Inokulation während der Interaktion mit *P. indica* induziert. Wie bereits erwähnt, konnte eine Produktion von H_2O_2 in dieser Interaktion jedoch nicht nachgewiesen werden (Vadassery *et al.*, 2009). Da Abwehrreaktionen in mutualistischen Reaktionen zwar in frühen Stadien, jedoch langsamer und schwächer als in pathogenen Interaktionen und meist lokal begrenzt ablaufen (Rancé *et al.*, 1998), kann es jedoch sein, dass es trotzdem zu einer schwächeren und verzögerten Bildung von H_2O_2 kommt, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen war. Dies könnte die Expression von *LOXI* induziert haben. Zudem ist ein rapider und starker Abbau von ROS ein primärer Mechanismus, der die Interaktion in einer mutualistischen Balance hält (Kogel, 2006). Demnach könnte es auch sein, dass ROS in dieser Interaktion deutlich schneller und effektiver abgebaut werden als in einer pathogenen Interaktion. Alternativ könnte die Induktion von *LOXI* (sowie auch von *OXII*, Kapitel 4.4.3) auch unabhängig vom *oxidative burst* erfolgt sein.

4.5 Kalzium-Abhängigkeit der untersuchten MATH-Proteine

Kalzium fungiert in allen Signalprozessen als ein universeller sekundärer Botenstoff. Seine Freisetzung z.B. ins Cytosol ist einer der ersten Vorgänge, der innerhalb von Sekunden oder Minuten abläuft. Dies konnte auch für die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* gezeigt werden (Vadassery *et al.*, 2009). Dieser cytosolische Kalziumeinstrom durch *P. indica* spielt damit eine Rolle in der Früherkennung des Pilzes.

Sowohl für MATH2 als auch für MATH3 wurde untersucht, ob sie verantwortlich (stromaufwärts) für den cytosolischen Kalziumeinstrom durch *P. indica* sind. Es zeigte sich, dass die Kalziumantwort von keinem der beiden Proteine abhängig ist (Kapitel 3.3). Sie sind demnach unabhängig oder stromabwärts davon. Dadurch wird bestätigt, dass die Proteine nicht an der Früherkennung des Pilzes und der darauf folgenden Signalweiterleitung in der

Zelle, sondern in einer anderen Phase der Interaktion beteiligt sind, wie bereits aus den Expressionsanalysen (Kapitel 4.4.2) hervorgegangen ist.

4.6 Lokalisierung und biochemische Charakterisierung von MATH1 und MATH2

Bisher wurde gezeigt, dass sowohl MATH1 als auch MATH2 wichtig für die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* sind. Bislang war jedoch nichts über diese Proteine bekannt. Deshalb wurden sie zunächst subzellulär lokalisiert. Beide Proteine wurden auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert (Kapitel 3.4.2 – 3.4.4). Mit Hilfe der Gefrierbruchmarkierung konnte die zweidimensionale Verteilung beider Proteine auf der Plasmamembran untersucht werden. Sie zeigte, dass beide MATH-Proteine immer in *Clustern* von einem Durchmesser von etwa 100 nm organisiert waren (Abb. 3.31). Die Grösse der *Cluster* entspricht in etwa der von *lipid rafts*. Beide MATH-Proteine könnten demnach in *lipid rafts* vorkommen. *Lipid rafts* spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, in dem sie eine konzentrierte Plattform für interagierende Proteine an der Plasmamembran zur Entstehung von Signalkaskaden schaffen (Simons und Toomre, 2000).

Weiterhin handelt es sich bei beiden MATH-Proteinen um periphere Membranproteine, die nur schwach über einzelne Aminosäuren mit der Plasmamembran verankert sind. Sie lösten sich bei der Proteinisolation leicht von der Plasmamembran ab. Dies zeigte sich zum Einen bei der Gefrierbruchmarkierung mit isolierten Plasmamembrananreicherungen, bei der der grösste Teil der markierten MATH-Proteine in löslichen Proteinaggregaten statt an den Membranvesikeln zu finden war (Abb. 3.28). Zum Anderen sind Proteine in *lipid rafts* nicht durch Membran-auflösende Detergentien wie Triton X-100 oder Nonidet P40 löslich, weshalb sie sich nach der Isolation aus dem Gewebe und Zugabe dieser Detergentien nicht elektrophoretisch auftrennen lassen. Dennoch sind beide MATH-Proteine durch das elektrische Feld gelaufen und konnten in einem anschliessenden Western blot nachgewiesen werden. Es ist unwahrscheinlich, dass beide MATH-Proteine durch Proteasen als natürlichen Aktivierungsmechanismus von der Plasmamembran abgespalten werden, da bei der Proteinextraktion Proteaseinhibitoren zugegeben wurden.

Proteine an der Plasmamembranaußenseite sind oft stark glykosyliert. Es wird vermutet, dass die Oligosaccharidketten dieser Proteine eine Rolle bei der Proteinerkennung, Adhäsion, Faltung oder dem Schutz vor Proteasen dienen könnten. Beide MATH-Proteine sind, obwohl sie an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert sind, nicht glykosyliert (Abb. 3.37). Die oben aufgezählten Eigenschaften haben somit vermutlich keine Bedeutung für die Funktionsweise der beiden MATH-Proteine. Dass beide MATH-Proteine offenbar keinen

Schutz vor Proteasen benötigen, obwohl an der Außenseite der Plasmamembran sehr viele Proteasen aktiv sind, könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide MATH-Proteine, anders als z.B. Strukturproteine, nur kurzlebig sind und damit eine hohe Umsatzrate besitzen. Dies könnte im Zusammenhang mit ihrem wahrscheinlichen Vorkommen in *lipid rafts* erklärt werden. *Lipid rafts* sind ebenfalls keine über längere Zeit konstanten Strukturen in der Plasmamembran, sondern entstehen direkt, wenn sie benötigt werden, und dissoziieren, sobald sie ihre Funktion erfüllt haben.

Darüberhinaus lässt sich MATH1 in einem Western blot immer als Doppelbande nachweisen (Kapitel 3.4.2). Es tritt somit in zwei verschiedenen Grössenvarianten auf, was entweder auf zwei verschiedene Spleissvarianten bei der Proteinbiosynthese oder eine posttranslationale Modifizierung zurückzuführen ist. Eine zeitliche sowie räumliche Verteilung beider Grössenvarianten konnte nicht gefunden werden; beide Varianten liessen sich immer zusammen nachweisen.

4.7 Putative Rollen von MATH1, -2 und -3 in *Arabidopsis*

MATH1 ist ein hoch abundantes Protein in Wurzeln und quellenden Samen und essentiell für die Keimung (Kapitel 4.1.1). Damit ist dieses Protein nicht ausschliesslich spezifisch für die Interaktion mit *P. indica*, sondern ebenfalls wichtig für Wachstums- und Entwicklungsprozesse der Pflanze. Während der Interaktion mit *P. indica* wird MATH1 in den Wurzeln von *Arabidopsis* transient modifiziert, wie anhand von zweidimensionaler Gelelektrophorese gezeigt wurde (Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Die chemische Natur der Modifizierung konnte noch nicht geklärt werden.

MATH2 ist ein weniger stark abundantes Protein als MATH1 und wird in Spross- und Wurzelgewebe auf Proteinebene gleichermassen exprimiert (Kapitel 3.4.2 – 3.4.4). Es ist daher auch für MATH2 unwahrscheinlich, dass es ausschliesslich in die Interaktion mit *P. indica* involviert ist, da der Pilz unter normalen Umständen nur die Wurzeln kolonisiert. Während der Interaktion mit *P. indica* wird die Expression des korrespondierenden Gens in der Phase, in der sich die Symbiose aufbaut, in den Wurzeln transient hochreguliert (Abb. 4.1). Die entsprechende *k.o.*-Linie verhält sich in der Wachstumsantwort auf *P. indica* reziprok zum WT (Kapitel 4.2.2) und wird durch den Pilz deutlich weniger kolonisiert als der WT (Abb. 3.19).

Auch *MATH3* wird in der Phase, in der sich die Symbiose aufbaut, ähnlich wie *MATH2* in den Wurzeln transient hochreguliert (Abb. 4.1), wobei die Regulation nur sehr schwach ist. Die entsprechende *k.o.*-Linie verhält sich ebenfalls wie bei *MATH2* in der Reaktion der

Wachstumsrate auf *P. indica* reziprok zum WT (Kapitel 4.2.2). Die Kolonisierung dieser *k.o.*-Linie durch den Pilz ist allerdings weniger reduziert als bei der *MATH2 k.o.*-Linie (Abb. 3.19).

Die Gene für MATH1, -2 und -3 liegen im *Arabidopsis*-Genom direkt hintereinander und haben alle die gleiche Genarchitektur eines Tandem-MATH-Motivs mit einer Sequenzhomologie von untereinander etwa 70 % auf Genomebene. Sie besitzen jedoch, sowohl in Wachstum und Entwicklung, als auch in der Interaktion mit *P. indica*, unterschiedliche Funktionen. Sie sind damit durch rapide Genduplikationsereignisse und anschließende funktionelle Divergenz entstanden (Ermolaeva *et al.*, 2003; Blanc und Wolfe, 2004; Gu *et al.*, 2005). Genduplikationsereignisse fanden vor 38 Mio Jahren oder später statt (Ermolaeva *et al.*, 2003). Folglich handelt es sich bei den drei MATH-Genen um noch relativ junge Gene. Im Vergleich dazu bildeten sich die ersten Symbiosen vor 460 Mio Jahren (Heckman *et al.*, 2001), was erklärt, warum die MATH-Proteine MATH2 und MATH3 vermutlich in nur einige, aber nicht in alle Signalwege während der Interaktion mit *P. indica* involviert sein könnten (Kapitel 4.2.2). Bei diesen Genduplikationsereignissen, die ein Hauptmerkmal der längerfristigen Evolution sind, geht ein Grossteil der duplizierten Gene verloren. Der Teil, der nicht verloren geht, bleibt funktionell redundant oder divergiert funktionell (Blanc und Wolfe, 2004). Durch funktionellen Divergenz, die mit asymmetrischen Veränderungen im Expressionsmuster (Gu *et al.*, 2005) und der Proteinsequenz duplizierter Gene einhergeht, kann es entweder zur Neofunktionalisierung oder Subfunktionalisierung dieser Gene kommen. Bei Neofunktionalisierung erwirbt eine Genkopie eine neue Funktion, bei Subfunktionalisierung bewahren beide Gene einen Teilsatz der Funktionalität des Vorfahrens (Force *et al.*, 1999). Somit handelt es sich bei der Divergenz zwischen MATH1 auf der einen Seite und MATH2 und MATH3 auf der anderen Seite um Neofunktionalisierung. Bei der Divergenz zwischen MATH2 und MATH3 fand vermutlich Subfunktionalisierung statt, da sich die entsprechenden *k.o.*-Linien in der Reaktion auf *P. indica* ähnlich verhalten und sie das gleiche zeitliche Expressionsmuster während der Interaktion mit *P. indica* aufweisen. Bei den genannten Genduplikationsereignissen sind Gruppen duplizierter Gene meist zusammen divergiert, wodurch parallele Netzwerke entstanden (Blanc und Wolfe, 2004). Vorrangig sind nach Genduplikationen Gene, die in Signaltransduktion und Transkription involviert sind, erhalten geblieben und funktionell divergiert (Blanc und Wolfe, 2004), wodurch sich die Komplexität des regulatorischen Netzwerkes erweitern konnte (Gu *et al.*, 2005). Die drei MATH-Proteine könnten folglich

ebenso in jeweils eigene Signaltransduktionsnetzwerke eingebunden sein, die ähnlich fungieren.

Die Funktionsweise der drei MATH-Proteine MATH1, -2 und -3 bleibt jedoch ungeklärt. MATH-Domänen konnten in verschiedenen Proteinen unterschiedlicher Organismen gefunden werden. Diese Proteine erfüllen dabei sehr verschiedene Funktionen. Für einige Proteine wird postuliert, dass die MATH-Domäne wichtig für die Untereinheitenassemblierung benachbarter Domänen ist (Sunnerhagen *et al.*, 2002). Für andere Proteine wurde herausgefunden, dass diese Domäne als Protein-Protein-Binde-Motiv fungiert (Uren und Vaux, 1996; Dow und Mains, 1998; Pintard *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2005; Gingerich *et al.*, 2005 und 2007; Kwon *et al.*, 2006). Proteine mit MATH-Domänen gibt es in allen Eukaryoten. Das MATH-Motiv scheint jedoch kein konserviertes und konstantes Element zu sein, das etwas über die Funktion des Proteins aussagt. Vielmehr scheint diese Domäne auf struktureller Ebene zur Funktionsweise (z.B. als Protein-Protein-Bindemotiv) des Proteins, in dem sie sich befindet, beizutragen.

Die Domänentopologie von MATH1, -2 und -3 lässt vermuten, dass es sich um Adapterproteine für die Interaktion weiterer Proteine handeln könnte. Es sind jedoch noch keine Interaktionspartner für die drei MATH-Proteine bekannt. In der Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* stellt sich die Frage, aus welchem der beiden Organismen die Interaktionspartner kommen. Aus zwei Gründen ist es wahrscheinlich, dass die Interaktionspartner selbst *Arabidopsis*-Proteine sind. Erstens ist MATH1 entscheidend für die Keimung der Samen. Das Einsetzen der Samenkeimung geschieht jedoch intern nach Perzeption abiotischer Signale und ohne Interaktion mit einem weiteren Organismus. Zweitens sind die anderen beiden MATH-Proteine zu nah verwandt zu MATH1, als dass Interaktionspartner aus einem anderen Organismus wahrscheinlich wären.

Wie bereits erwähnt sitzen MATH1 und -2 an der Außenseite der Plasmamembran und sind vermutlich in *lipid rafts* organisiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass dies auch für MATH3 zutrifft. *Lipid rafts* bilden sich, um *raft*-Proteine und interagierende Proteine in einem Netzwerk zu verbinden, um daraus Signalkaskaden einzuleiten. Sie bestehen aus Rezeptoren, Adapter- und Stützproteinen (Simons und Toomre, 2000). Die untersuchten MATH-Proteine könnten dabei als Adapterproteine fungieren, um entweder extrazelluläre Proteine an diese *rafts* zu rekrutieren oder um *raft*-interne Proteine miteinander zu dimerisieren. Um zu verstehen, wie diese drei MATH-Proteine auf molekularer Ebene letztendlich zu Wachstum und Entwicklung der Pflanze, als auch zur Interaktion mit *P. indica*

beitragen ist es notwendig, sowohl die Interaktionspartner als auch das jeweilige Netzwerk der davon abgeleiteten Signalwege dieser MATH-Proteine zu kennen.

Referenzen

- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005): Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824 – 827
- Alessi DR (2001): Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medical Lecture. *Biochem Soc Trans* **29**: 1 – 14
- Anderson-Prouty AJ, Albersheim P (1975): Host-pathogen interactions VIII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogens host. *Plant Physiol* **56**: 286 – 291
- Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NHT, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman MA; Nielsen HB, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J (2005): The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO* **24**: 2579 – 2589
- Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ayax C, Levy J, Debelle F, Baek JM, Kalo P, Rosenberg C, Roe BA, Long SR, Denarie J, Cook DR (2004): *Medicago trunculata* DMI1 required for bacterial and fungal symbiosis in legumes. *Science* **303**: 1364 – 1367
- Anthony RG, Henriques R, Helfer A, Mészáros T, Rios G, Testerink C, Munnik T, Deák M, Koncz C, Bögre L (2004): A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO* **23**: 572 – 581
- Anthony RG, Khan S, Costa J, Pais MS, Bögre L (2006): The *Arabidopsis* protein kinase PTI1-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXI1. *J Biol Chem* **281**: 37536 – 37546
- Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB (1998): Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**: 2821 – 2830
- Asai TG, Tena J, Plotnikova MR, Willmann WL, Chiu L, Gomez-Gomez T, Boller F, Ausubel M, Sheen J (2002): Map Kinase Signalling Cascade in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Nature* **415**: 977 – 983
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997): Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science* **276**: 726 – 733
- de Bary (1879): The phenomenon of symbiosis. *Botanische Zeitung*. Verlag Trubner, Straßburg
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-rolan V, Jauneau A, Portais J, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N (2006): Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* **4**: 1239 – 1247
- Blanc G, Wolfe KH (2004): Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *Plant Cell* **16**: 1679 – 1691
- Bögre L, Ökrész L, Henriques R, Anthony RG (2003): Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and AGC protein kinases. *Trends Plant Sci* **8**: 424 – 431
- Boller T (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* **46**: 189 – 214
- Bond JS, Beynon RJ (1995): The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci* **4**: 1247 – 1261
- Boucher L, Marengere LEM, Lu Y, Thukral S, Mak TW (1997): Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* **233**: 592 – 600

- Bronstein JL (1994): Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution* **9** : 214 – 217
- Bronstein JL (2001): The exploitation of mutualisms. *Ecology letters* **4**: 277 – 287
- Bucking H, Heyser W (2003): Uptake and transfer of nutrients in ectomycorrhizal associations: interactions between photosynthesis and and phosphate nutrition. *Mycorrhiza* **13**: 59 – 68
- Bütehörn B, Rhody D, Franken P (2000): Isolation and characterization of *Pitef1* encoding the translation elongation factor EF-1 α of the root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Biology* **2**: 687 – 692
- Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **14**: 703 – 711
- Cheng G, Cleary AM; Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D (1995): Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* **267**: 1494 – 1498
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H (2002): All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* **115**: 679 – 688
- Cullimore JV, Ranjeva R, Bono JJ (2001): Perception of chito-oligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* **6**: 24 – 30
- Dan I, Watanabe NM, Kusuki A (2001): The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* **11**: 220 – 230
- Dangl JF and Jones JDG (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826 – 833
- David R, Itzhaki H, Ginzberg I, Gafni Y, Galili G, Kapulnik Y (1998): Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 489 – 497
- Deak M, Casamayor A, Currie RA, Downes CP, Alessi DR (1999): Characterization of a plant 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett* **451**: 220 – 226
- DeshmukhS, Hückelhoven R, Schäfer P, Imani J, Sharma M, Waller F, Kogel KH (2006): The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis in barley. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18450 – 18457
- Dow MR, Mains PE (1998): Genetic and molecular characterization of the *Caenorhabditis elegans* gene, *mel-26*, a postmeiotic negative regulator of MEI.1, a meiotic-specific spindle component. *Genetics* **150**: 119 – 128
- Drissner D, Kunze G, Callewaert N; gehrig P, Tamasloukht MB, Boller t (2007) : Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* **318**: 265 – 268
- Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2000): Modulation of host defense system. In Kapulnik Y, Douds DD Jr, eds, *Arbuscular Mycorrhizae: Physiology and Function*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp 173 – 200
- Egger KN, Hibbett DS (2004): The evolutionary implications of exploitation in mycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1110 – 1121
- Egger KN (2006): The surprising diversity of ascomycetous mycorrhizas. *New Phytologist* **170**: 421 – 423
- Endré G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB (2002): A receptor kinase gene regulating symbiotic

- nodule development. *Nature* **417**: 962 – 966
- Ermolaeva MD, Wu M, Eisen JA, Salzberg SL (2003): The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Mol Biol* **51**: 859 – 866
- Farooq A, Chaturvedi G, Mujtaba S, Plotnikova O, Zeng L, Dhalluin C, Ashton R, Zhou MM (2001): Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: Structural insights into MKP-3 activation by ERK2. *Molecular Cell* **7**: 387 – 399
- Feilner T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RGH, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D, Cahill DJ, Lehrach H, Kreutzberger J, Kersten B (2005) High Throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**: 1558 – 1568
- Figueroa P, Gusmaroli G, Serino G, Habashi J, Ma L, Shen Y, Feng S, Bostick M, Callis J, Hellmann H, Deng XW (2005): *Arabidopsis* has two redundant Cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with RBX1 and BTB proteins to form multisubunit E3 ubiquitin ligase complexes in vivo. *Plant Cell* **17**: 1180 – 1195
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999): Preservation of duplicated genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **15**: 1531 – 1545
- Fujimoto K (1995): Freeze-fracture labeling replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* **108**: 3443 – 3449
- Gadkar V, David-Schwartz R, Kunik T, Kapulnik Y (2001): Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiol* **127**: 1493 – 1499
- Garcia-Garrido JM, Ocampo JA (2002): Regulation of the plant defense response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot* **53**: 1377 – 1386
- Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estel M, Ma L, Vierstra RD (2005): Cullins 3a and 3b assemble with members of the Broad complex/Tramtrack/Bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **280**: 18810 – 18821
- Gingerich DJ, Hanada K, Shiu S-H, Vierstra RD (2007): Large-scale, lineage-specific expansion of a Bric-a-brac/Tramtrack/Broad complex ubiquitin-ligase gene family in Rice. *Plant Cell* **19**: 2329 – 2348
- Gorbea CM, Flannery AV, Bond JS (1991): Homo- and heterotetrameric forms of the membrane-bound metalloendopeptidases meprin A and B. *Arch Biochem Biophys* **290**: 549 – 553
- Grunwald U, Nyamsuren O, Tamasloukht M, Lapopin L, Becker A, Mann P, Gianinazzi-Pearson V, Krajinski F, Franken P (2004): Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscle development-related expression profile. *Plant Mol Biol* **55**: 553 – 566
- Gu X, Zhang Z, Huang W (2005): Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast in gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 707 – 712
- Guo BZ, An ZQ, Hendrix JW (1994): A mycorrhizal pathogen (*Glomus macrocarpum* Tul. & Tul.) of tobacco: effects of long-term cropping on the mycorrhizal fungal community and stunt disease. *Applied Soil Ecology* **1**: 269 – 276
- Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y, Azuma T, Yasuda T (2006): Activation of *Arabidopsis* MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta* **223**: 708 – 713

- Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehlting J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Seguin A, Ellis BE (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci* **11**: 192 – 198
- Hammond-Kosack K, Parker J (2003): Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 177 – 193
- Harrisson MJ, Dewbre GR, Liu J (2002): A phosphate transporter from *Medicago trunculata* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413 – 2429
- Heath MC (2000): non-host resistance and non-specific plant defences. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 315 – 319
- Heath MC (2001): Non-host resistance of plant pathogens: non-specific defense or the result of specific recognition events? *Physiol Mol Plant Pathology* **58**: 53 – 54
- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB (2001): Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Sci* **293**: 1129 – 1133
- Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ (2000): Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbiosis in basidiomycetes. *Nature* **407**: 506 – 508
- Hibbett DS, Schüßler A, (2007): A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Research* **111**: 509 – 547
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T (2004): In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *PNAS* **101**: 8821 – 8826
- Imaizumi-Anraku H, Takeda H, Charpentier M, Perry J, Miwa H, Umehara Y, Kouchi H, Murakami Y, Mulder L, Vickers K, Pike J, Downie JA, Wang T, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Yoshikawa M, Murooka Y, Wu GJ, Kawaguchi M, Kawasaki S, Parniske M, Hayashi M (2005): Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **433**: 527 – 531
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant J* **24**: 655 – 665
- Ishimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giaudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998): Isolation of AtMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 532 – 543
- Janos DP (1996): Mycorrhizas, succession, and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. J.C. Frankland, N. Magan, G.M. Gadd (eds.). Fungi and environmental changes. British Mycological Society Symposium. Cambridge University Press, Cambridge, England
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997): Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**: 575 – 586
- de Jong C, Laxalt A, Bargmann B, de Wit P, Joosten M, Munnik T (2004): Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr-4 interaction. *Plant J* **39**: 1 – 12
- Kaldorf M, Koch B, Rexer KH, Kost G, Varma A (2005): Patterns of interaction between *Populus* Esch5 and *Piriformospora indica*: A transition from mutualism to antagonism. *Plant Biol* **7**: 210 – 218
- Kalo P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J (2005): Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **17**: 1786 – 1789.

- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, N, Stougaard J (2006): A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 527 – 531
- Karandashov V, Nagy R, Wegmüller S, Amrhein N, Bucher M, (2004): Evolutionary conservation of a phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6285 – 6290
- Kistner C, Parniske M (2002): Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* **7**: 511 – 518
- Kistner C (2005): Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* **17**: 2217 – 2229
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1996): Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**: 489 – 503
- Kogel KH, Franken P, Hüchelhoven R (2006): Endophyte or parasite – what decides? *Curr Opin Plant Biol* **9**: 358 – 363
- Komander D, Fairservice A, Deak M, Kular GS, Prescott AR, Downes CP, Safrany ST, Alessi DR, van Aalten DMF (2004): Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates. *EMBO* **23**: 3918 – 3928
- Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Denarie J, Barker DG (2003): A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago trunculata*. *Plant Physiol* **131**: 952 – 962
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED (2008): Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 9823 – 9828
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci, USA* **97**: 2940 – 2945
- Kroj T, Rudd JJ, Nürnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D (2003): Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* **278**: 2256 – 2264
- Kuldau GA, Yates IE (2000): Evidence for *Fusarium* endophytes in cultured and wild plants. Microbial Endophytes (C.W. Bacon and J.F. White, eds): 85 – 120. Marcel Dekker, New York and Basel
- Kwon JE, La M, Oh KH, Oh YM, Kim GR, Seol JH, Baek SH, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, Joe CO, Chung CH (2006): BTB domain-containing Speckle-type POZ protein (SPOP) serves as adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul-3-based ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. **281**: 12664 – 12672
- Laxalt AM, Munnik T (2002): Phospholipid signaling in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 332 – 338
- Lee J, Rudd JJ, Macioszek VK, Scheel D (2004): Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem* **279**: 22440 – 22448
- Lee JS, Ellis BE (2007): *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (AtMKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *J Biol Chem* **283**: 25020 – 25029
- van Leuwen W, Ökrész L, Bögre L, Munnik T (2004): Learning the lipid language of plant signalling. *Trends Plant Sci* **9**: 378 – 384
- Levy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Denarie

- J, Rosenberg C, Debelle F (2004): A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbiosis. *Science* **303**: 1361 – 1364
- Liu CM, Meinke DW (1998): The *titan* mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *Plant J* **16**: 21-31
- Liu Y, Zheng S (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3386 – 3399
- Llompарт B, Castells E, Rio A, Roca R, Ferrando A, Stiefel V, Puigdomènech P, Casacuberta JM (2003): The direct activation of MIK, a germinal center kinase (GCK)-like kinase, by MARK, a maize atypical receptor kinase, suggests a new mechanism for signaling through kinase-dead receptors. *J Biol Chem* **278**: 48105 – 48111
- Maccarone M, van Zadelhoff G, Veldink GA, Vliegthart JFG, Finazzi-Agró A (2000): Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *Eur J Biochem* **267**: 5078 – 5084
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N (2003): A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637 – 640
- Mandyam K, Jumpponen A (2005): Seeking the elusive function of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* **53**: 173 – 189
- MAPK Group (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**: 301 – 308
- Marchand P, Tang J, Bond JS (1994): Membrane association and oligomeric organization of the alpha and beta subunits of mouse meprin A. *J Biol Chem*. **269**: 15388 – 15393
- Marchand P, Tang J, Johnson GD, Bond JS (1995): COOH-terminal proteolytic processing of secreted and membrane forms of the α subunit of the metalloprotease meprin A. *J Biol Chem* **270**: 5449 – 5456
- Marchand P, Volkmann M, Bond JS (1996): Cysteine mutations in the MAM domain result in monomeric meprin and alter stability and activity of the proteinase. *J Biol Chem* **271**: 24236 – 24241
- Marx J (2004): The roots of plant-microbe collaborations. *Science* **304**: 234 – 236
- Mc Whirter SM, Pullen SS, Holton JM, Crute JJ, Kehry MR, Alber T (1999): Crystallographic analysis of CD40 recognition and signalling by human TRAF2. *Proc Nat Acad Sci* **96**: 8408 – 8413
- Meijer HJG, Munnik T (2003): Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 265 – 306
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 765 – 769
- Modjo HS, Hendrix JW (1986): The mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* as a cause of tobacco stunt disease. *Phytopathology* **76**: 688 – 691
- Montesano M, Brader G, Palva ET (2003): Pathogen-derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol* **4**: 73 – 79
- Mora A, Komander D, van Aalten DMF, Alessi DR (2004): PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 161 – 170

- Munnik T (2001): Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* **6**: 227 – 233
- Murashige T, Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and Bio Assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473 – 497
- Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczylglowski K (2007): A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**: 101 – 104
- Newman EI, Reddell P (1987): The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol* **106**: 745 - 751
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C (2004): Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1365 – 1377
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Lizelle P (2004): Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Research* **198**: 249 – 266
- Oelmüller R, Peškan-Berghöfer T, Shahollari B, Trebicka A, Sherameti I, Varma A (2005): MATH domain proteins represent a novel protein family in *Arabidopsis thaliana*, and at least one member is modified in roots during the course of a plant-microbe interaction. *Physiol Plant* **124**: 152 – 166
- Oldroyd GED, Engstrom EM, Long SR (2001): Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago trunculata*. *Plant Cell* **13**: 1835 – 1849
- Oldroyd GED (2007): Nodules and hormones. *Science* **315**: 52 – 53
- Otterhag L, Gustavsson N, Alsterfjord M, Pical C, Lehrach H, Gobom J, Sommarin M (2006): *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochim* **88**: 11 – 21
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO* **22**: 1282 – 1288
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H (1999): Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **398**: 533 – 538
- Parniske M (2000): Intracellular accomodation of microbes by plants: a common development programm for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol* **3**: 320 – 328
- Peck SC (2003): Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 334 – 338
- Peiter E, Sun J, Heckmann, AB, Venkatheshwaran M, Riely BK, Otegui MS; Edwards A, Freshour G, Hahn MG, Cook DR, Sanders D, Oldroyd GED, Downie JA, Ané JM (2007): The *Medicago trunculata* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol* **145**: 192 – 203
- Peškan-Berghöfer T, Shahollari B, Giong PH, Hehl S, Markert C, Blanke V, Kost G, Varma A, Oelmüller R (2004): Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modification in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiol Plant* **122**: 465-477
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J (2000): *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111 – 1120
- Pham GH, Kumari R, Singh A, Sachdev M, Prasad R, Kaldorf M, Buscot F, Oelmüller R, Peškan T, Weiss M, Hampp R, Varma A (2004): Axenic cultures of *Piriformospora indica*. In: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R (eds) Plant Surface Microbiology. Springer-Verlag, Germany, pp 593 – 616

- Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson J-LF, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M (2003): The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin ligase. *Nature* **425**: 311 – 316
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* **130**: 15 – 21
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N (2003): Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585 – 592
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Jurkiewicz A, Fukai E, Quistgaard EMH, Albrechtsen A, James EK, Thirup S, Stougaard J (2007): LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* **26**: 3923 – 3935
- Rancé I, Fournier J, Esquerré-Tugayé MT (1998): The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceed Natl Acad Sci USA* **95**: 6554 – 6559
- Rausch C, Bucher M (2002): Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216**: 23 – 37
- Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grieson CS, Hirt H, Knight MR (2004): OXI1 is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**: 858 – 861
- Robenek H, Severs NJ (2008): Recent advances in freeze-fracture electron microscopy: the replica immunolabeling technique. *Biol Proceed* **10**: 9 – 19
- Rothe M, Wong S, Henzel WJ, Goeddel DV (1994): A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**: 681 – 692
- Rothe M, Sarma V, Dixit VW, Goeddel DV (1995): TRAF2-mediated activation of I κ B by TNF receptor 2 and CD40. *Sci* **269**: 1424 – 1427
- Rudgers JA, Swaffold AL (2007): Benefits of a fungal endophyte in *Elymus virginicus* declines under drought stress. *Basic and Applied Ecology* **10**: 43 – 51
- Ruiz-Lozano JM, Roussel H, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1999): Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. In wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 976 – 984
- Saage A (2008): Diplomarbeit, Universität Jena
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie JA, Parniske M, Hayashi M, Kawaguchi M (2007): NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbiosis, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**: 610 – 624
- Salzer P, Boller T (2000): Elicitor-induced reactions in mycorrhizae and their suppression. In GK Podila, DD Douds, eds, *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, MN, pp 1 – 10
- Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ (2004): Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes. *Ann Rev Plant Biol* **55**: 315 – 340
- Schneider A, Walker SA, Poyser S, Sagan M, Ellis TH, Downie JA (1999): Genetic mapping and functional analysis of a nodulation-effective mutant (*sym19*) of Pea (*Pisum sativum* L.). *Mol Gen Genet* **262**: 1 – 11

- van Schooten B, Testerink C, Munnik T (2006): Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 151 – 159
- Schulz B, Guske S, Dammann U, Boyle C (1998): Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* **25**: 213 – 227
- Schulz B, Boyle C (2005): The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**: 661 – 686
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001): A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Research* **105**: 1413 – 1421
- Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, Teige M (2007): The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acids, and ethylene levels in *Arabidopsis* (W). *Plant Cell* **19**: 2213 – 2224
- a) Shahollari B, Peškan-Berghöfer T, Oelmüller R (2004): Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol Plant* **122**: 397 – 403
- b) Shahollari B, Varma A, Oelmüller R (2004): Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *J Plant Physiol* **162**: 945 – 958
- Sherameti I, Shahollari B, Venus Y, Altschmied L, Varma A, Oelmüller R (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in Tobacco and *Arabidopsis* through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *J Biol Chem* **28**: 26241 – 26247
- Shirasu K, Schulze-Lefert P (2000): Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**: 371 – 385
- Simons K, Toomre D (2000): Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31 – 39
- Singh An, Singh Ar, Kumari M, Rai MK, Varma A (2003): Importance of *Piriformospora indica*, a novel symbiotic mycorrhiza-like fungus: an overview. *Plant biotechnology. Indian J Biotechnol* **2**: 65 – 75
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T, Geurts R (2005): NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**: 1789–1791
- Smit P, Limpens E, Geurts R, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T (2007): Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial Nod factor signaling. *Plant Physiol* **145**: 183 – 191
- Smith DC, Douglas AE (1987): The biology of symbiosis. London: Edward Arnold
- Smith SE, Read DJ 2nd ed, (1997): Mycorrhizal symbiosis. Academic press, San Diego and London
- Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE (2001): Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**: 2285 – 2289
- Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W (1995): The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, seralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* **4**: **823** – 840
- Storz P, Toker A (2002): 3'-Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci* **7**: 886 – 902
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Tougaard N, Szczyglowski K, Parniske M (2002): A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959 – 962
- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM (2006): Crosstalk between jasmonic acid,

- ethylene and Nod factor signalling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* **46**: 961 – 970
- Sunnerhagen M, Pursglove S, Fladvad M (2002): The new MATH: homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers. *FEBS letters* **530**: 1 – 3
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 805 – 818
- Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV (1996): Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem* **271**: 19935 – 19942
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Doczi F, Ishimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **15**: 141 – 152
- Testerink C, Munnik T (2005): Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 368 – 375
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrechtsen AS, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Stougaard J (2007): A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**: 104 – 107
- Tsukuba T, Bond JS (1998): Role of the COOH-terminal domains of Meprin A in folding, secretion, and activity of the metallopeptidase. *J Biol Chem* **273**: 35260 – 35267
- Uren AG, Vaux DL (1996): TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *TIBS* **21**: 244 – 245
- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, Camehl I, Varma A, Shahollari B, Novák O, Strnad M, Ludwig-Müller J, Oelmüller R (2008): The role of Auxins and Cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interactions* **21**: 1371 – 1383
- Vadassery J, Ranf S, Drzewiecki C, Mithöfer A, Mazars C, Scheel D, Lee J, Oelmüller R (2009): A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J* (in press)
- Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P (1999): *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl. & Environ. Microb.* **65**: 2741 – 2744
- Varma A, Singh A, Sudha, Sahay NS, Sharma, J, Roy A, Kumari M, Rana D, Thakran S, Deka D, Bharti, K, Hurek T, Bleichert O, Rexer KH, Kost G, Hahn A, Maier W, Walter M, Strack D, Kranner I (2000): *Piriformospora indica*: An axenically cultivable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In Hock B (ed.), *The Mycota IX – Fungal Associations*. Springer-Verlag, Heidelberg
- Varma A, Singh A, Sudha S, Sahay N, Sharma J, Roy A, Kumari M, Rana D, Thakran S, Deka D, Bharti K, Franken P, Hurek T, Bleichert O, Rexer KH, Kost G, Hahn A, Hock B, Maier W, Walter M, Strack D, Kranner I (2001): *Piriformospora indica*: a cultivable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In *Mycota IX*. Springer, Berlin, pp 123 – 150
- Verma SA, Varma A, Rexer KH, Hassel A, Kost G, Sarbhoy A, Bisen P, Bütehorn B, Franken P (1998): *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* **90**: 898 – 905
- Vierheilig H, Alt M, Lange J, Gut-Rella M, Wiemken A, Boller T (1995): Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3031 – 3034

- Villa JP, Bertenshaw GP, Bylander JE, Bond JS (2003): Meprin proteolytic complexes at the cell surface and in extracellular spaces. *Biochemical Society Symposium* **70**: 53-63
- Waller F, Achatz B, Baltrusch H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceed Natl Acad Sci USA* **102**: 13386 – 13391
- Wang X (2004): Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 329 – 336
- Weber H, Bernhardt A, Dieterle M, Hano P, Mutlu A, Estelle M, Genschik P, Hellmann H (2005): *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MTH protein family. *Plant Physiol* **137**: 83 – 93
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001): Regulation of growth by cytokinin. *Proceed Natl Acad Sci USA* **98**: 10487 – 10492
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143 – 180
- Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin T-H, Vidal M, Elledge SJ, Harper JW (2003): BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**: 316 – 321
- Yamaguchi T, Kido H, Katunuma N (1992): A membrane-bound metallo-endopeptidase from rat kidney. Characteristics of its hydrolysis of peptide hormones and neuropeptides. *European Journal of Biochemistry* **204**: 547-552
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2003): Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320**: 3 – 21
- Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H (1999): The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Molecular Cell* **4**: 321 – 330
- Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcated MAPK cascades in C₂H₄ signaling. *Nature* **451**: 789 – 795
- Yoshida S, Parniske M (2005): Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **280**: 9203 – 9209
- a) Zegzouti H, Anthony RG, Jahchan N, Bögre L, Christensen SK (2006): Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *Proceed Natl Acad Sci USA* **103**: 6404 – 6409
- b) Zegzouti H, Li W, Lorenz TC, Xie M, Payne CT, Smith K, Glenn S, Payne GS, Christensen SK (2006): Structural and functional insights into the regulation of *Arabidopsis* AGC VIIIa kinases. *J Biol Chem* **281**: 35520 – 35530
- Zhao S, Qi X (2008): Signalling in plant disease resistance and symbiosis. *J Integrative Plant Biol* **50**: 799 – 807
- Zwerg K, Hirt H (2001): Recent advantages in plant MAP kinase signalling. *Biol Chem* **382**: 1123 – 1131

Anhang

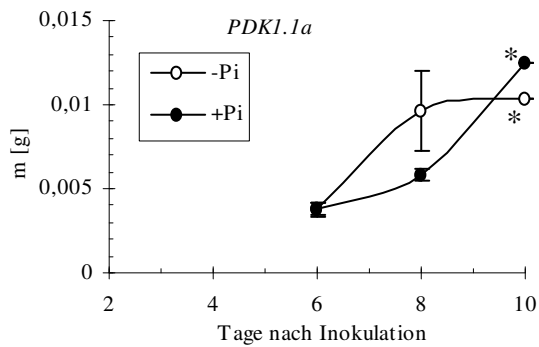


Abb. Anhang1: Wachstumsreaktionen der *PDK1.1a* *k.o.*-Mutante auf *P. indica*, wenn beim WT Wachstumsinhibition zu beobachten war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomasse der Wurzeln eines Versuchs (*Werte entsprechen dem Mittelwert von 10 Einzelwurzeln, die zusammen gemessen wurden). Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

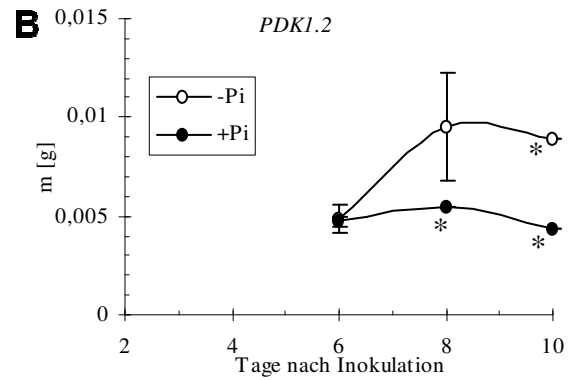
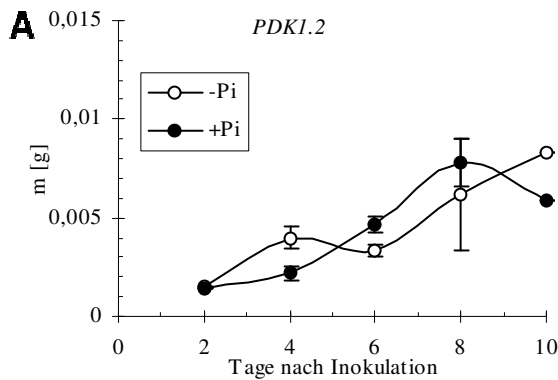


Abb. Anhang 2: Wachstumsreaktionen der *PDK1.2* *k.o.*-Mutante auf *P. indica*, wenn (A) der WT nicht reagierte bzw. (B) beim WT Wachstumsinhibition zu beobachten war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomasse der Wurzeln eines Versuchs (*Werte entsprechen dem Mittelwert von 10 Einzelwurzeln, die zusammen gemessen wurden). Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

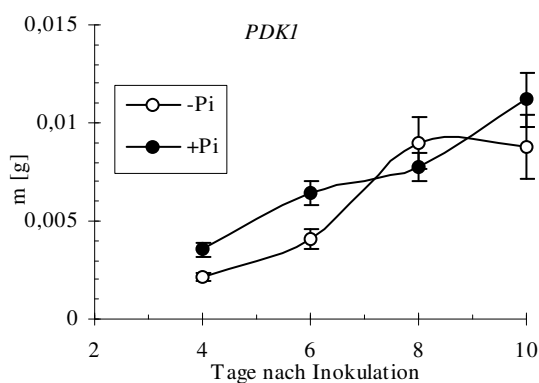


Abb. Anhang 3: Wachstumsreaktionen der *PDK1* *d.k.o.*-Mutante auf *P. indica*, wenn der WT nicht reagierte. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomasse der Wurzeln aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

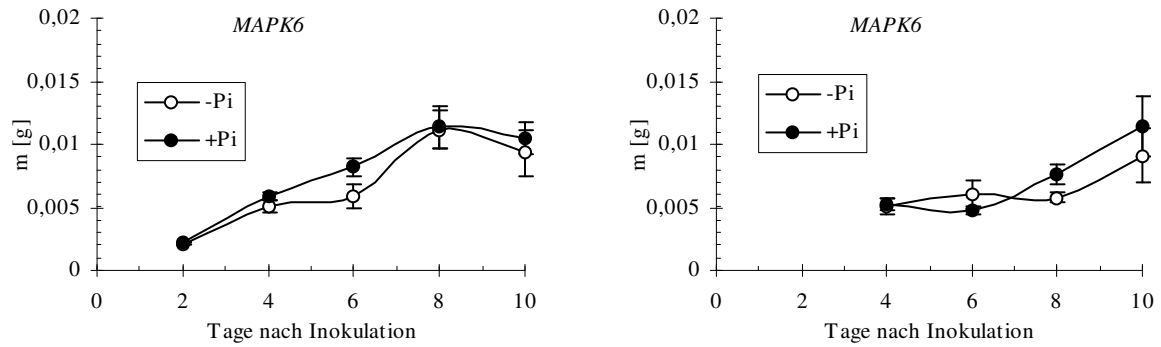


Abb. Anhang 4: Wachstumsreaktionen der *MAPK6* *k.o.*-Mutante auf *P. indica*, wenn (A) der WT nicht reagierte bzw. (B) beim WT Wachstumsinhibition zu beobachten war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomasse der Wurzeln (A) aus zwei unabhängigen Versuchen bzw. (B) eines Versuchs. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

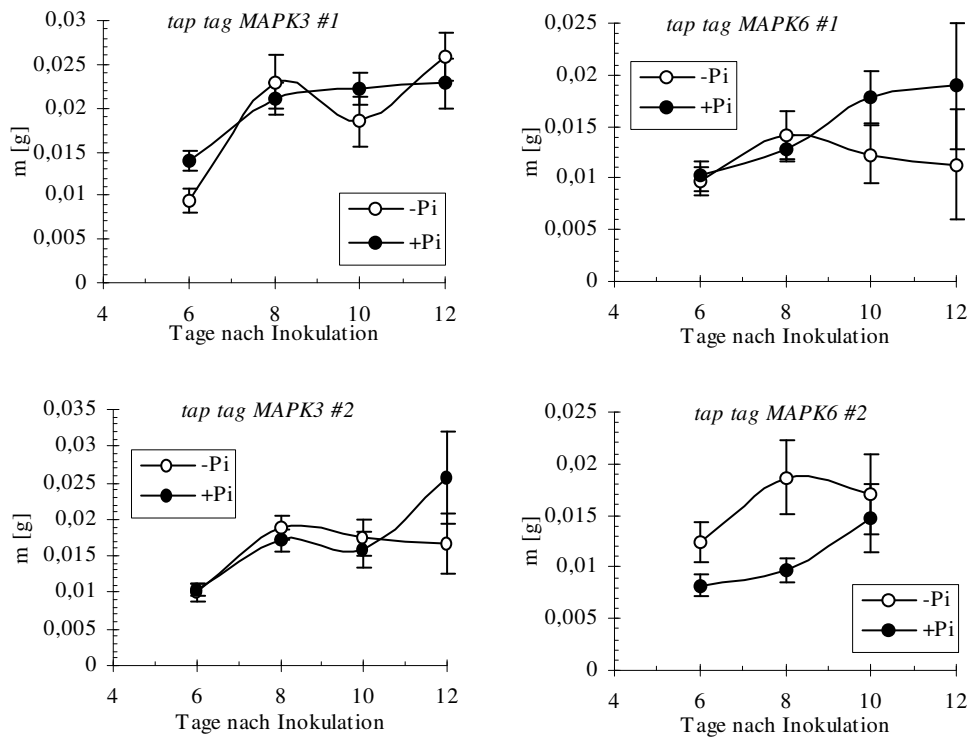


Abb. Anhang 5: Komplementationsanalyse für *MAPK3* *k.o.* und *MAPK6* *k.o.* in der Antwort auf *P. indica*. Für beide *k.o.*-Linien wurden je 2 *tap-getaggte* Linien verwendet, die mit dem Pilz ko-kultiviert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte je eines Versuchs, bei dem zu jedem Zeitpunkt je 10 Pflanzen gemessen wurden. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

Publikationen

Sherameti I, Venus Y, Drzewiecki C, Tripathi S, Dan SV, Nitz I, Varma A, Grundler FM, Oelmüller R (2008): PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J* **54**: 428-39.

Vadassery J, Ranf S, Drzewiecki C, Mithöfer A, Mazars C, Scheel D, Lee J, Oelmüller R (2009): A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J* (in Druck)

Drzewiecki C, Eitner A, Westermann M, Oelmüller R (2009): MATH domain containing proteins involved in *Arabidopsis thaliana* – *Piriformospora indica* interaction. (in Bearbeitung)

Camehl I, Drzewiecki C, Forzani C, Vadassery J, Shahollari B, Hirt H, Oelmüller R (2009): PDK1 and OXI1 control the interaction of *Arabidopsis* with the endophytic fungus *Piriformospora indica*. (in Bearbeitung)

Vorträge

Drzewiecki C (2006): Signal transduction in plant-fungus interaction. Mitteldeutsches Symposium der Pflanzenphysiologie, Dresden

Drzewiecki C (2008): MATH domain-containing proteins in *Piriformospora indica* / *Arabidopsis thaliana* interaction. Mitteldeutsches Symposium der Pflanzenphysiologie, Jena

Posterpräsentationen

Drzewiecki C, Oelmüller R (2006): MATH proteins involved in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and *Piriformospora indica*. Tagung „Signalaustausch zwischen Wurzeln und Mikroorganismen“, Göttingen

Drzewiecki C, Oelmüller R (2007): MATH proteins involved in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and *Piriformospora indica*. Deutsche Botanikertagung, Hamburg

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ausschliesslich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt zu haben. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters noch die Hilfe Dritter, nicht in dieser Arbeit erwähnter Personen, in Anspruch genommen. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form an einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, den

.....

Corinna Drzewiecki

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R. Oelmüller für die Vergabe dieses Themas, seine Betreuung, Ideen und Diskussionen bedanken.

Bei PD Dr. M. Westermann und Dr. A. Eitner bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Lokalisationsstudien und die gute Betreuung währenddessen.

Tatjana Peškan-Berghöfer danke ich für ihre Vorarbeit und grundlegende Etablierung dieses Versuchssystems. Meine Arbeit hat maßgeblich darauf aufgebaut.

Weiterhin möchte ich mich bei der Pilzgruppe (Bationa Shahollari, Yvonne Venus, Jyothi Vadassery, Iris Camehl, Eileen Seebald und Joy Michael Johnson) für die Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Paul Hein, Lars Dietzel, Yvonne Schröter, Sebastian Steiner und Ute Holtzegel für technische Details und Fragen im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Dr. Katharina Bräutigam, die mir nicht nur mit wissenschaftlichem, sondern auch freundschaftlichem Rat oft zur Seite gestanden hat.

Ich danke auch PD Dr. T. Pfannschmidt und Dr. K. Appenroth dafür, dass ich mich bei verschiedensten Anliegen an sie wenden konnte.

Nina Habermann und Julia Sauer danke ich für das Zurechtfinden in einem fremden Labor.

Wesentlich für das Gelingen einer Doktorarbeit ist immer auch die technische Unterstützung. Dafür danke ich unseren technischen Assistentinnen Sarah Mußbach, Janin Kuntze, Claudia Röppischer und Heide Becker sowie Ulrich Weber.

Der DFG und dem SFB 604 danke ich für die Finanzierung dieses Projekts.

Ich danke auch Daniel, Susanne, Hagen, Ulrike, Franziska, Monika, Timo, Matthias und Anne für ihre Begleitung und Anteilnahme ausserhalb des Labors.

Und vor allem danke ich Ulf für seine Liebe, Geduld und Offenheit und vor allem für seine Zuversicht.